İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPİRULİNA PLATENSİS'TEN ELDE EDİLEN BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ENKAPSÜLASYONU VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine Simge KARLIĞA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

AĞUSTOS, 2020

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPİRULİNA PLATENSİS'TEN ELDE EDİLEN BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ENKAPSÜLASYONU VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine Simge KARLIĞA
506171518

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gamze TOYDEMİR ŞEN

AĞUSTOS, 2020

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506171518 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Emine Simge KARLIĞA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "*SPİRULİNA PLATENSİS*'TEN ELDE EDİLEN BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ENKAPSÜLASYONU VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr. Öğr. Üyesi Gamze TOYDEMİR ŞEN** .....
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Funda KARBACIOĞLU GÜLER** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Aslı CAN KARAÇA .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Celale KIRKIN .....
Özyeğin Üniversitesi

Teslim Tarihi : 15 Haziran 2020
Savunma Tarihi : 11 Ağustos 2020

Aileme ve tüm sevdiklerime,

ÖNSÖZ

Her şeyden önce, sevgili danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN'e tüm süreç boyunca bana sağladığı destek ve rehberlik için, beni her zaman güleryüzle ve içtenlikle karşıladığı için özellikle teşekkür etmek istiyorum.

Bunun yanı sıra, tüm çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen ve her konuda fikir veren Dr. Öğr. Üyesi Aslı Can KARAÇA'ya yüksek lisans dönemimdeki desteği için teşekkür etmek istiyorum. Ayrıca eş danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Gamze TOYDEMİR ŞEN'e de teşekkür ederim.

Ayrıca Arş. Gör. Sena BAKIR'a, Arş. Gör. Duygu CEYLAN'a ve çok değerli dostum Rukiye GÜNDOĞAN'a gösterdikleri sabır ve deneysel çalışmamda yaptıkları yardımlardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bunlara ek olarak yüksek lisans dönemim boyunca gösterdikleri sevgileri, sonsuz destekleri ve sabırları için tüm arkadaşlarıma, sevdiklerime ve özellikle aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Haziran 2020

E. Simge Karlığa
Biyomühendis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **Vİİ**
İÇİNDEKİLER ..... **İX**
KISALTMALAR ..... **Xİ**
SEMBOLLER ..... **Xİİİ**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **XV**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **XVİİ**
ÖZET ..... **XİX**
SUMMARY ..... **XXİ**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Tezin Amacı 1
1.2 Literatür Araştırması 1
1.2.1 Siyanobakteriler 2
Spirulina platensis 4
1.2.2 Biyoaktif peptitler 8
1.2.2.1 Genel bilgi 8
1.2.2.2 Sağlık üzerine etkileri 12
1.2.2.3 Elde edilme yöntemleri 16
1.2.2.4 Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu 20
1.3 Hipotez 22
2. MATERYAL-METOT **23**
2.1 Materyaller 23
2.1.1 Spirulina platensis 23
2.1.2 Selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis* 23
2.1.3 *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit 23
2.1.4 Selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit 23
2.1.5 Enkapsüle biyoaktif peptit 24
2.2 Metotlar 24
2.2.1 Biyoaktif peptit eldesi için yöntem ve enzimin belirlenmesi 25
2.2.2 Biyoaktif peptitlerin ultrafiltrasyonla izolasyonu 25
2.2.3 Biyoaktif peptitlerin kurutulması – Liyofilizasyon metodu 28
2.2.4 Biyoaktif peptitlerin saflaştırılması 29
2.2.5 Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu 29
2.2.6 *İn vitro* gastrointestinal sindirim modeli ile biyoyararlılık analizleri 31
2.2.7 Spektrofotometrik analizler 34
2.2.7.1 Toplam fenolik madde analizi 34
2.2.7.2 Toplam antioksidan kapasite analizi 35
2.2.8 Protein analizi 36
3. SONUÇ VE ÖNERİLER **39**
3.1 Sonuçlar 39
3.1.1 Hidrolizat analizleri 39
3.1.2 Antioksidan analizleri 41
3.1.2.1 Toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite sonuçları 41
3.1.2.2 *İn vitro* biyoyararlılık analizinden elde edilen örneklerde toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite sonuçları 43

3.1.2.3 Enkapsülasyon verimi sonuçları 53
3.1.2.4 Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri 55
3.1.2.5 Bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi sonuçları 56
3.1.2.6 Optimizasyon ve validasyon sonuçları 58
3.2 Öneriler 58
4. KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ 69

KISALTMALAR

ABTS **:** 2,2-Azinobis(3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfonik Asit) Diammonyum Tuzu

BAP **:** Biyoaktif Peptit

DPPH **:** 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

FDA **:** İlaç ve Gıda İdaresi (Food and Drug Administration)

FPLC **:** Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi

GMA **:** Gama Linolenik Asit (γ- Linolenik Asit)

GRAS **:** Tüketilmesi Güvenli Olan (Generally Recognized As Safe)

HPLC **:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

PHB **:** Poli-Beta-Hidroksibutirik Asit

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

RP-HPLC **:** Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

TAK **:** Toplam Antioksidan Kapasite

TFM **:** Toplam Fenolik Madde

SEMBOLLER

$CaCl_2.2H_2O$: Kalsiyum Klorür Dihidrat
$CuCl_2..2H_2O$: Bakır (II) Klorür
HCl : Hidroklorik Asit
KCL : Potasyum Klorür
$KH_2\ PO_4$: Mono Potasyum Fosfat
$K_2S_2O_8$: Potasyum Persülfat
$(MgCl)_2.6H_2O$: Magnezyum Klorür Hekzahidrat
N : Azot
NaCl : Sodyum Klorür
$NaHCO_3$: Sodyum Bikarbonat
NH_4Ac : Amonyum Asetat
$(NH_4)_2CO_3$: Amonyum Karbonat
P : Fosfor

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: *Spirulina platensis*'in büyümesini etkileyen faktörler ((Gershwin & Belay, 2007) 'den düzenlenmiştir.). **7**
Çizelge 3.1: Selenyum ilavesiz ve farklı oranlarda selenyum ilaveli *Spirulina platensis* örneklerinin protein içerikleri. **39**
Çizelge 3.2: Farklı metotla *Spirulina plantensis*'in hidrolizatlarından elde edilen protein oranları. **40**
Çizelge 3.3: Alkalaz enzimi ile SpKonrol örneklerinin hidrolizi sonrası protein ve nem oranları. **41**
Çizelge 3.4: Ham (normal koşullarda elde edilmiş) *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numunelerinin ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitlerin (SpBAP ve SeBAP) antioksidan özellikleri. **42**
Çizelge 3.5: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TFM içeriği. **43**
Çizelge 3.6: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TAK değerleri (CUPRAC (bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi) metodu). **45**
Çizelge 3.7: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TAK değerleri (DPPH metodu). **46**
Çizelge 3.8: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TAK değerleri (ABTS metodu). **47**
Çizelge 3.9: Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin enkapsülasyon verimi, toplam fenolik madde içeriği (TFM) ve TAK (CUPRAC metodu) ifade eden modellerin regresyon katsayıları. **54**
Çizelge 3.10: S. Platensis'ten elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP) için enkapsülasyon öncesi ve sonrası TFM ve CUPRAC içeriği **60**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: *Spirulina platensis*'in mikroskop görüntüsü. **5**
Şekil 1.2: *Spirulina platensis* kültürünün yapıldığı alanlar. **6**
Şekil 1.3: Peptitlerin gelişimi ve uygulamaları ((Kadam ve diğ., 2015)'ten uyarlanmıştır). **10**
Şekil 1.4: *Spirulina* spp.'dan alınan fikosiyaninin 3 boyutlu yapısı (Satyanarayana ve diğ., 2008). **12**
Şekil 1.5: Biyoaktif peptit eldesi (Agyei & Danquah, 2011). **18**
Şekil 2.1. Tez kapsamında gerçekleştirilen metotlar **24**
Şekil 3.1. Ham (normal koşullarda elde edilmiş) *S.platensis* numunesinin (Sp) *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı. **49**
Şekil 3.2. Selenyum ile zenginleştirilmiş *S.platensis* numunesinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı. **50**
Şekil 3.3. Normal koşullarda elde edilmiş *S.platensis*' den elde edilen biyoaktif peptitlerin *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı..... **51**
Şekil 3.4. Selenyum ile zenginleştirilmiş *S.platensis'* den elde edilen biyoaktif peptitlerin *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı..... **52**
Şekil 3.5. Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyon veriminin aljinat konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonu ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği. ... **55**
Şekil 3.6. Biyoaktif peptitlerin toplam fenolik madde içeriğinin aljinat konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonu ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği. **56**
Şekil 3.7. Biyoaktif peptitlerin bakır indirgeyici antioksidan kapasitesinin aljinat konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonu ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği. **57**

SPİRULİNA PLATENSİS'TEN ELDE EDİLEN BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ENKAPSÜLASYONU VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Vücudumuzda gerçekleşen metabolik faaliyetlerin devamlılığı açısından günlük diyette protein içeren gıdaları tüketmenin önemi büyüktür. Proteinlerin beslenmemizdeki önemi beslenme uzmanları tarafından da her fırsatta vurgulanmaktadır. Proteince zengin gıdalar aynı zamanda, protein molekülü içerisinde inaktif halde bulunan ancak proteinlerin hidrolizi ile biyofonksiyonel özellikleri açığa çıkan, vücut fonksiyonları üzerine pozitif etkileri olan spesifik protein kısımları olarak tanımlanan biyoaktif peptitlerin de kaynağıdır. Biyoaktif peptitler, oral yolla alındığında aminoasit dizilimlerine bağlı olarak kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık ve sinir sistemlerine etki edebilmektedirler. Fakat biyoaktif peptitler geniş çaptaki pozitif etkilerine rağmen kimyasal olarak stabil olmayan, kısa *in vivo* yarı ömrü olan ve oral biyoyararlığı düşük bileşenlerdir. Bu nedenle, enkapsülasyon gibi işlemlerle biyopeptitlerin fonksiyonelliği, biyoyararlılığı, stabilitesi ve hedeflenen etkinliği optimum düzeyde sağlanabilmektedir.

Spirulina platensis, dünyada en fazla kültürü yapılan, kozmetikte, tıpta, insan ve hayvan gıdası olarak çeşitli sanayi alanlarında kullanılan mavi-yeşil algler sınıfından iğ iplikli siyonabakteridir. Kuru maddede yaklaşık %60-70 protein içeriği ile pek çok gıdadan daha yüksek miktarda sindirilebilir protein içeriğine sahiptir. *Spirulina* ortak adı ticari kullanımda, siyanobakteri, *Spirulina platensis*'in kurutulmuş biyokütlesini ifade eder ve biyolojik kökenli bir bütün üründür.Yapılan araştırmalarda *Spirulina*'nın antiviral, antikanser, antidiyabetik, antibiyotik, antioksidan, bağışıklık sistemini güçlendirici, kardiyovasküler sistemi koruyucu, hipokolesterolomik ve antialerjik etkileri olabileceği tespit edilmiş ve bu pozitif etkilerin nedeni olarak da zengin biyoaktif madde içerikleri gösterilmiştir. *Spirulina*'nın fonksiyonelliği, gelişimi sırasında besiyerine güçlü bir antioksidan mineral olan selenyum eklenmesi yolu ile arttırılabilmektedir. Selenyum eksikliğinde koroner kalp hastalığı, keshan hastalığı, çoklu skleroz, müsküler distrofi, romatoid artrit ve katarakt gibi hastalıkların görülme oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina* selenyum eksikliğine sahip hastalar için iyi bir biyolojik kaynak olabilmektedir. Bununla birlikte, selenyum birikiminin *Spirulina platensis*'in biyokütle, fotosentetik pigment ve protein oluşumuna katkıda bulunarak kalitesini artırdığı bildirilmiştir.

Ülkemizde *Spirulina* üretimi Çukurova Üniversitesi, Ege Üniversitesi ve Çanakkale Üniversitesi bünyesinde gerçekleştirilmekte ve gıda takviyesi şeklinde piyasaya sunulmaktadır. Fakat artan ilgiye rağmen *Spirulina*'nın ülkemizdeki gıda uygulamaları sınırlı olup endüstriyel çapta uygulanmamaktadır.

Bu tez kapsamında, ilk aşamada, Çukurova Üniversitesi'nden temin edilen *Spirulina platensis*'ten biyoaktif peptit eldesinde en uygun yöntemin tespiti için biyoaktif

peptitlerin izolasyonu ve saflaştırılması işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada, elde edilen biyoaktif peptitlerin fonksiyonellik, biyoyararlılık ve stabilite özelliklerini iyileştirmek amacıyla enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan çalışma kapsamında, katma değeri yüksek, gıdalarda ingrediyen olarak kullanılabilecek enkapsüle biyoaktif peptitler üretilmiştir. Bu tez çalışması ile Spiriluna'nın alternatif fonksiyonel besin kaynağı olarak kullanımının ülkemiz ekonomisine katkı sağlaması açısından rehberlik edeceği öngörülmektedir.

ENCAPSULATİON OF BİOACTİVE PEPTİDES OBTAİNED FROM SPİRULİNA PLATENSİS AND DETERMİNATİON OF THEİR ANTİOXİDANT PROPERTİES

SUMMARY

The consumption of protein-containing foods in the diet has great importance in terms of the progression of metabolic activities in our body. The importance of proteins in our diet are often emphasized. Protein-rich foods are also the source of bioactive peptites. Bioactive peptites have been defined as specific protein fractions that have a positive effect on body functions or conditions and may finally influence health. Such peptites are inactive within the sequence of the parent protein and can show their biofunctional properties by the hydrolyzation of the parent proteins. Upon oral administration, bioactive peptites may affect the cardiovascular, digestive, immune, and nervous systems depending on their amino acid sequence. Although the bioactive peptites have broad positive effects, they are chemically unstable, have short *in vivo* half-lives, and have low oral bioavailability. Therefore, the optimum functionality, bioavailability, stability, and target effect of the bioactive peptites can be provided by encapsulation techniques.

Spirulina platensis is a prokaryotic organism in the cyanobacteria class and has a filamentous, spiral-shaped structure. It is the most cultured blue-green algae in the world and used in the fields of cosmetics, medicine, animal feed production. The common name Spirulina in commercial use refers to the dried biomass of cyanobacteria, *Spirulina platensis*, and is a whole product of biological origin. With its 60-70% protein content in dry matter, various researchers have shown that *Spirulina* has antiviral, anticancer, antidiabetic, antibiotic, antioxidant, hypocholesterolemic, antiallergic effects and enhances the immune system as well as protects the cardiovascular system and these effects are attributed to their high bioactive peptite content.

On the other hand, the functionality of *Spirulina* can be increased by the addition of selenium to the media during its growth. It is known that, selenium deficiency may lead to such diseases as ischemic heart disease, Keshan disease, multiple sclerosis, muscular dystrophy, rheumatoid arthritis, and cataracts. For this reason, selenium-enriched *Spirulina* may be a good biologic source for selenium-deficient individuals. Additionally, many works have shown that selenium accumulation can improve the quality of *Spirulina platensis* by enhancing its production of biomass, photosynthetic pigments, and protein concentrations.

In our country, *Spirulina* is produced in Çukurova University, Ege University, and Çanakkale University and presented as a food supplement to the market. However, although the attention on *Spirulina* was increased, its food applications are very limited and to the best of our knowledge it is not used at industrial-scale food production in Turkey.

Within the scope of the thesis, the evaluation and selection of the most suitable method for isolation and purification of biopeptites from *Spirulina platensis* obtained from Çukurova University was performed. In the next stage, the functional properties of the biopeptites were obtained, and in order to improve the bioavailability and stability of the biopeptites encapsulation was performed.

Consequently, high value-added encapsulated bioactive peptites were produced which may be used as an ingredient in foods. With this thesis, the use of *Spirulina* as an alternative functional food ingredient was evaluated to contribute to the Turkish economy.

1 GİRİŞ

Bu tez kapsamında, *Spirulina platensis'*in özellikleri ve enkapsülasyonu hakkında literatür araştırılması yapılmış olup, yapılan araştırma ve deneysel kısım içindekiler kısmına uygun olarak aşağıdaki şekilde yazılmıştır.

1.1 Tezin Amacı

Bu tezin temel amacı, proteince zengin içeriğe sahip bir siyanobakteri olan *Spirulina platensis* ve antioksidan aktiviteye sahip bir mineral olan selenyum ile zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'ten biyoaktif peptitlerin izolasyonu ve enkapsülasyonu, bu peptitlerin enkapsülasyon işlemi öncesi ve sonrasında toplam fenolik miktarı, antioksidan özellikleri ve toplam azot miktarı gibi karakteristik özelliklerini belirlemek, antioksidan özelliklerinin ve *in vitro* biyoyararlılıklarının belirlenmesi ve karşılaştırılmasıdır.

Tezin hedefleri; yüksek oranda biyoaktif peptit eldesi için optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi ve ekstrakte edilen biyoaktif peptitlerin yüksek oranda saflaştırılması; saf biyoaktif peptitlerin enkapsülasyon işlemi ile antioksidan özelliklerinin, *in vitro* biyoyarayışlılıklarının arttırılmasıdır.

1.2 Literatür Araştırması

Proteinlerin diyette biyolojik olarak aktif role sahip oldukları gün geçtikçe artan bir şekilde kabul görmektedir. Geçtiğimiz yıllarda diyet ile birlikte alınan proteinlerin yüksek bir biyoaktif peptit kaynağı olduğu onaylanmıştır. Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonları üzerine pozitif etkileri olan spesifik protein kısımları olarak tanımlanmaktadır. Bu peptitler protein molekülü içerisinde inaktif haldedirler ve protein molekülünün enzimatik sindirim veya fermentasyon sonucu hidrolizi ile biyofonksiyonel özellikleri açığa çıkmaktadır. Biyoaktif peptitler, oral yolla alındığında aminoasit dizimlerine bağlı olarak kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık ve sinir sitemlerine etki edebilmektedirler (Fan ve diğ., 2014; Korhonen & Pihlanto,

2006). Buna bağlı olarak, biyoaktif peptit tüketim miktarını artırmak amacı ile biyoaktif peptitlerce zenginleştirilmiş çeşitli fonksiyonel gıdalar üretilmektedir (Hartmann & Meisel, 2007).

Biyoaktif peptitler geniş çaptaki pozitif etkilerine rağmen kimyasal olarak stabil olmayan, kısa *in vivo* yarı ömrü olan ve oral biyoyararlığı düşük bileşenlerdir (Kadam ve diğ., 2015). Bu nedenle, enkapsülasyon gibi işlemlerle biyoaktif peptitlerin optimum fonksiyonelliği, biyoyararlılığı, stabilitesi ve hedeflenen etkinliği sağlanabilmektedir. Bu strateji ile biyoaktif peptitlerin mide ve bağırsaktan kana taşınımı sırasında herhangi bir denatürasyon ya da fiziksel deformasyon olmadan biyolojik fonksiyonelliklerinin korunması amaçlanmaktadır (Saadi ve diğ., 2015).

1.2.1 Siyanobakteriler

Yaygın olarak mavi-yeşil algler olarak bilinen siyanobakteriler (siyanoprokaryotlar) ökaryotik alglerin evriminde önemli bir konuma sahiptir ve Prekambriyen döneminin mikrofosillerinden kaydedilen en eski canlı organizmalardır. Bakteri hücrelerinin prokaryotik doğasına benzemekle birlikte, oksijen gelişen fotosentetik sistemin varlığı ile ökaryotik alglere benzerler. Siyanobakteriler sıcaklık, ışık, tuzluluk, pH ve kuruma ve beslenme durumu gibi aşırı fiziksel koşullarda ortaya çıkar. Yapısal özellikleri arasında, muramik asit ve glikopeptitlerden yapılmış hücre duvarı, tek tilakoid lamel, aksesuar pigmentler olarak suda çözünür fikobilin pigmentlerinin varlığı ve gaz vezikülleri adı verilen özel bir vakuol türü bulunur (Anand ve diğ., 2018).

Siyanobakteriler bu gezegendeki başlıca oksijen üreticileri olarak en eski canlılardan biri olmasının yanısıra şu anda da Dünya'daki yaşamı etkilemeye devam etmektedir. Başlıca oksijen üreticilerinden olduğundan tüm dünyadaki ekosistemlerin ve aşırı ortamların son derece önemli bileşenlerinden biri halindedir (Gaysina ve diğ., 2018).

Genel olarak, siyanobakteri hücreleri, ortalama büyüklüğü 1-30 mm olan çoğu bakteriden daha büyüktür. Siyanobakteriler morfolojik olarak tek hücreli form, heterosistsiz filament formlar ve heterosistli filament formlar olmak üzere 3 temel morfolojik forma sahiptir (Percival & Williams, 2013).

Siyanobakteriler fotoototrofiktir, yani hücresel karbon materyallerini üretmek için fotosentez yapar. Fotosentez için çoğunlukla klorofil-a ile ışık enerjisi kullanırlar ve bu süreçte oksijen üretirler. Bu türün bir kısmı, karbon kaynağı olarak organik bileşikler kullanarak heterotrofik olarak da büyüyebilir. Çevresel koşullardan

yararlanmak adına birkaç milyar yıldan daha uzun sürede gelişen bir özellik olarak siyanobakteriler fosfor (P) ve azot (N) bakımından zengin koşullar altında, bu bileşenleri hücre içine alarak hücre içerisinde depolar.Bazı siyanobakteriler ise sucul ortamlarda yüzmelerini sağlayan proteinli gaz vakuolleri üretebilir. Gaz vakuolleri silindir şeklindedir ve konik uç kapakları ile kapatılmıştır. Siyanobakteriler de böylece kayma hareketliliği sergileyebilir (Percival & Williams, 2013).

Ayrıca siyanobakteriler düşük oksijen ve serbest sülfür seviyesine yüksek tolerans gösterebilmektedir. Buna ek olarak da, H_2S'yi H_2O yerine bir foto indirgeyici olarak kullanma kabiliyetine ve ultraviyole B ve C radyasyonları için yüksek derecede tolere edebilme kapasitesine sahiptir (Gaysina ve diğ., 2018).

Uygun koşullar altında üretken bir şekilde büyüyebilen siyanobakteriler, tatlı su göllerinde ve rezervuarlarında "alg çiçeği" olarak adlandırılır. Siyanobakteriler tarafından üretilen bir dizi ikincil metabolit potansiyel olarak toksiktir ve alg çiçeklenmeleri sırasında hem yerel ekolojiye hem de hayvanların ve insanların sağlığına zararlı etkilere yol açabilir (Reichwaldt & Ghadouani, 2012).

Bunlara karşın bitki ve hayvanlarda nadir bulunan çoklu doymamış yağ asitleri gibi çeşitli kimyasallar ve biyokimyasallar için kaynak olarak kullanılabilir. Gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde sentetik pigmentlerin yerine doğal pigmentler olarak kullanılabilir. Özellikle gıda endüstrisinde, mikroalglerden üretilebilen çeşitli doğal pigmentler için artan bir talep vardır. Spirulin'dan elde edilmiş fikosiyanin içeren bir gıda renklendiricisi, Japon şirketi Dainippon Ink & Chemicals Inc. (DIC, Tokyo) tarafından 'Lina blue-A' markası altında pazarlanmaktadır; aynı şirket Spirulina'dan elde edilen ancak suda çözünür olmamak için modifiye edilmiş başka bir fikosiyanin üretmektedir, böylece su veya ter ile ıslandığında akmadığı için göz farı, göz kalemi ve ruj için kullanılabilmektedir (Avigad Vonshak, 1996).

Çok çeşitli besin bileşikleri ve çeşitli pigmentler üretebilmelerinin yanı sıra çok hızlı gelişebilen Oscillatoria, Anabaena ve Spirulina türleri özellikle ilgi çekmiş ve sıklıkla kullanılmışlardır (Kargin ve diğ., 2011). Özellikle *Spirulina platensis* üzerinde oldukça fazla araştırma yapılmış ve hücre kültürü açısından teknoloji çok iyi bir şekilde test edilmiş ve maliyet açısından daha uygun olması sebebiyle de diğerlerine göre daha çok tercih edilmektedir (Li & Qi, 1997).

1.2.1.1 Spirulina platensis

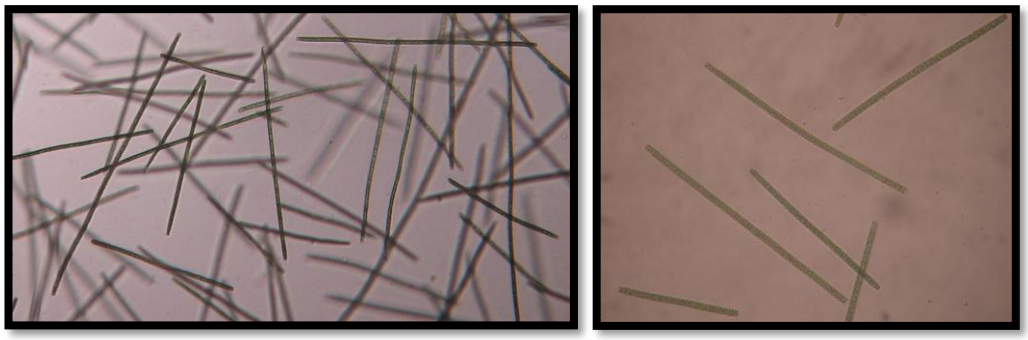
Spirulina platensis; biyolojisi, biyoteknolojik uygulamaları ve sağlık uygulamaları hakkında ve biyoyakıt üretimi gibi uzak uygulamalar gibi görünen ve uzay araştırmalarında yaşam destek sistemi olarak araştırmacılar tarafından ilgi çekmektedir (Gershwin & Belay, 2007).

Genel bilgi

Spirulina platensis, yüksek seviyelerde karbonat ve bikarbonat ve yüksek pH (11'e kadar) ile karakterize edilen tropikal ve subtropikal su kütlelerinde büyük popülasyonlar oluşturan planktonik siyanobakterilerdir (Avigad Vonshak, 1996).

Spirulina ortak adı ticari kullanımda, siyanobakteri, Arthrospira *platensis*'in kurutulmuş biyokütlesini ifade eder ve biyolojik kökenli bir bütün üründür. Taksonomik kullanımında ise, genellikle gıda, diyet takviyesi ve yem takviyesi olarak kullanılan iki Cyanobacteria, A. *platensis* ve A. maxima türünü tanımlamak için kullanılan bir isimdir. *Spirulina platensis* de Arthrospira *platensis*'i ifade eder (Gershwin & Belay, 2007).

Pek çok farklı bölgede yetişebilen *Spirulina platensis* esas olarak Afrika'da, Asya ve Güney Amerika'da bulunan yaygın bir türdür. Aynı zamanda Çad Gölü'nde ve Rift Vadisi'ndeki Sudan-Sahel bölgesinde de hakim bir türdür (Busson, 1971). Çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal koşullar, heliks geometrisini etkileyebilir. Bu geometri sabit bir özellik olarak kabul edilmekle birlikte, aynı türün farklı suşları arasındaki ve aynı suş içindeki sarmallık derecesinde önemli farklılıklar olabilir. Artrospira (*Spirulina*) türleri morfolojide bu sebeple büyük esneklik gösterebilir. Doğada yetiştiğinde ve kültürü yapıldığında, Arthrospira sıkıca sarılmış formdan düz bir sargısız forma kadar değişen boyut ve sargı derecesinde sarmal trikomlar oluşturur. Arthrospira türlerindeki trikomlar ışık mikroskobu altında belirgin enine çapraz duvarlar gösterir. Filamanlar yalnızdır ve ikili fisyon ile çoğalırlar. Trikomların genişliğ 3-12 μm arasında değişebilir, ancak bazen 16 μm'ye kadar ulaşabilir. Hücre organizasyonu, zara bağlı organel eksikliği olmayan tipik bir prokaryottur (Avigad Vonshak, 1996).



Şekil 1.1: Spirulina platensis'in mikroskop görüntüsü.

Spirulina, numunelerde kuru ağırlığın %45'i ve laboratuvarda yetiştirilen S. *platensis*'te %62'lik yüksek protein içeriğine sahiptir. Daha yeni analizler, proteinin kuru ağırlığın %60'ından fazlasını ve bazı örneklerde de %70'ini temsil ettiğini doğrulamıştır. *Spirulina*'nın protein içeriği, tek hücreli algler ve diğer siyanobakterilerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmektedir.(Gershwin & Belay, 2007)

Spirulina, büyük miktarlarda bitkisel protein (%70 kuru ağırlık), karotenoid (4000 mg/kg), omega-3 ve omega-6, nadir esansiyel yağ asidi olan gama linolenik asit (GLA) gibi çoklu doymamış yağ asitlerini; sülfolipidler, glikolipidler, polisakkaritler, provitaminler; A vitamini, E vitamini, çeşitli B vitaminleri gibi diğer besinleri; ve kalsiyum, demir, magnezyum, manganez, potasyum, çinko ve selenyum gibi mineralleri içerir (Gershwin & Belay, 2007).

Ayrıca *Spirulina* sp. siyanobakteriler arasında besin değeri nedeniyle en iyi bilinen cinstir. Bilinen 20 aminoasitten 18'ini içerir; yüksek kaliteli proteinler; sütten daha fazla kalsiyum; inek karaciğerinden daha fazla B12 vitamini; A, B2, B6, E, H ve K vitaminleri ve tüm gerekli mineraller, eser elementler ve enzimler. *Spirulina*, çeşitli organik sağlık takviyeleri arasında en zengin demir kaynaklarından biridir.

Bağırsak patojen mikroorganizmalarının enfeksiyonundan korunma, bağışıklık sisteminin uyarılması, daha iyi sindirim ve laktoz ve minerallerin emilmesi, gezgin ishali önleme, bebeklerde ishal ve rotavirüs enfeksiyonunun azaltılması, yaşlılarda kabızlığın önlenmesi, antibiyotiklerin uygulanmasından sonra bağırsak mikroflorasının daha hızlı bir şekilde yeniden kolonileşmesine katkıda bulunma, laktoz intoleransında iyileşme, kandaki kolesterol seviyesinin azaltılması, bağışıklık sisteminin uyarılması, ve kansere karşı savunmanın iyileştirilmesi gibi yararları sebebiyle hem genel halk hem de beslenme uzmanları tarafından tercih edilmektedir.

Doğal ortamından kendiliğinden büyüyebilmesinin yanı sıra doğal ortamında ya da endüstriyel olarak da üretilebilmektedir. Yüksek kaliteli protein, demir, gama linolenik yağ asidi, karotenoidler, B1 ve B2 vitaminleri de dahil olmak üzere bazı makro ve mikro besinlerin değerli bir ek besin kaynağı olarak kabul edilir. Ayrıca ilaç ve gıdalara katkı maddesi elde etmek için kullanılabildiğinden dolayı açık rezervuarlarda ve özellikle kapalı foto biyoreaktörlerde *Spirulina* yetiştiriciliği yapılabilir ve bu esnada, biyokütlesi yüksek biyoyararlı formda demir, iyot, selenyum, çinko, bakır, manganez ve krom gibi bazı eser elementlerle zenginleştirilebilir (Gershwin & Belay, 2007).



Şekil 1.2: *Spirulina platensis* kültürünün yapıldığı alanlar.

Siyanobakterilerin büyümesi Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi farklı ortam koşullarına bağlıdır.

Çizelge 1.1: *Spirulina platensis*'in büyümesini etkileyen faktörler ((Gershwin & Belay, 2007) 'den düzenlenmiştir.).

Faktörler	**Optimum Değer**
Sıcaklık	18-24
Tuzluluk	20-24
Işık yoğunluğu	2,5-5
Fotoperiyot	24:0
pH	8,2-8,7

1970'lerin başında, yarı doğal bir üretim tesisinde yıllık üretimde 100 ila 400 ton arasında büyük bir değere sahipken; bu yüzyılın sonunda yaklaşık 25 yıl sonra, yıllık olarak 1000 tonu aşan toplam yıllık üretime ulaşmıştır (Avigad Vonshak, 1996).

Kullanım alanları

Bir ürünün kullanım alanını belirleyen yegane etken fonksiyonelliğinin yanı sıra üretim maliyetidir. Geleneksel ürünlere göre kısa yaşam döngüsü, yıl boyunca sürekli ürün vermesi, genetik mühendisliğine yatkın olması, sınırlı kaynak olan tatlı su yerine acı ve tuzlu sularda yetişebilmesi gibi pek çok avantaja sahip olan mikroalglerin yetiştirilmesi üretim maliyetini düşürmektedir (Avigad Vonshak, 1996).

Uzun yıllardır araştırmacıların ilgisini çekmiş olan *Spirulina platensis*, ilk ne zaman kullanıldığı tam olarak bilinmemekle beraber yüzyıllardır insanların kullandığı bir besin maddesidir. 1970'lerde dünyada ilk defa *Spirulina*'nın üretilmesi ile bu konudaki araştırmalar doruğa ulaşmıştır (Gershwin & Belay, 2007).

Sadece gıda besin maddesi olarak değil sahip olduğu moleküller sebebiyle (enzim, pigment vb.) de önemli bir konumdadır. Gıda, ilaç, kozmetik ve kimya alanlarında kullanılabilen pek çok molekül, *Spirulina platensis* gibi mikroalglerden elde edilebilir (Avigad Vonshak, 1996).

Ayrıca *Spirulina platensis*, çoğu bitki türünün sulanması için uygun olmayan ve genellikle yarı kurak bölgelerde yetiştirilebilmesi ve elde edilen ürünlerin ucuz ve yüksek protein içeriğine sahip olması sebebiyle tercih edilebilir (Avigad Vonshak, 1996).

Spirulina'nın çeşitli hastalıkların tedavisinde etkinliği çeşitli deneysel test sistemlerinde ve klinik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, son birkaç yılda,

birçok ek farmakolojik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Diğer alerjiler, anemi, kanser, hepatotoksisite, viral ve kardiyovasküler hastalıklar, hiperglisemi, hiperlipidemi, immün yetmezlik ve enflamatuar süreçleri tedavi etmenin etkili olduğu *in vivo* ve *in vitro* deneylerle kanıtlanmıştır (Gershwin & Belay, 2007).

Örneğin *Spirulina platensis*'te bulunabilen ve bir çeşit polisakkarit olan poli-beta-hidroksibutirik asit (PHB), *Spirulina*'nın üstel büyümesi sırasında birikir. Kuru ağırlığının %6'sına kadar biriken PHB besin değerlerinin yüksek olması sebebiyle agar, alginik asit ve karagenan gibi hayvanlar için yem olarak kullanılabileceği yaygın olarak kabul edilmektedir (Avigad Vonshak, 1996).

Spirulina 2003'ten beri FDA (İlaç ve Gıda İdaresi (Food and Drug Administration)) tarafından tüketilmesi güvenli olan (GRAS (Generally Recognized As Safe)) ürün olarak tanımlanmıştır. 50 yıldan uzun süredir ticari olarak üretilmektedir ancak satın alınırken; mikrobiyal, ağır metal, pestisit kontaminasyonu ve toksin gibi ürün güvenliğini tehlikeye atabilecek mevcudiyetlere dikkat edilmeli bu sebeple sadece belirli standartlara sahip ürünler tüketilmelidir.

1.2.2 Biyoaktif peptitler

Biyoaktif peptitler bitkilerden, hayvanlardan veya deniz kaynaklarından elde edilebilir. Biyoaktif peptitler; opiat, antitrombotik, anti-hipertansif, immünomodülatör, antilipemik, osteoprotektif, antioksidatif, antimikrobiyal, ileum büzülme, antikarsinojenik ve büyümeyi teşvik edici özellikler gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir.

1.2.2.1 Genel bilgi

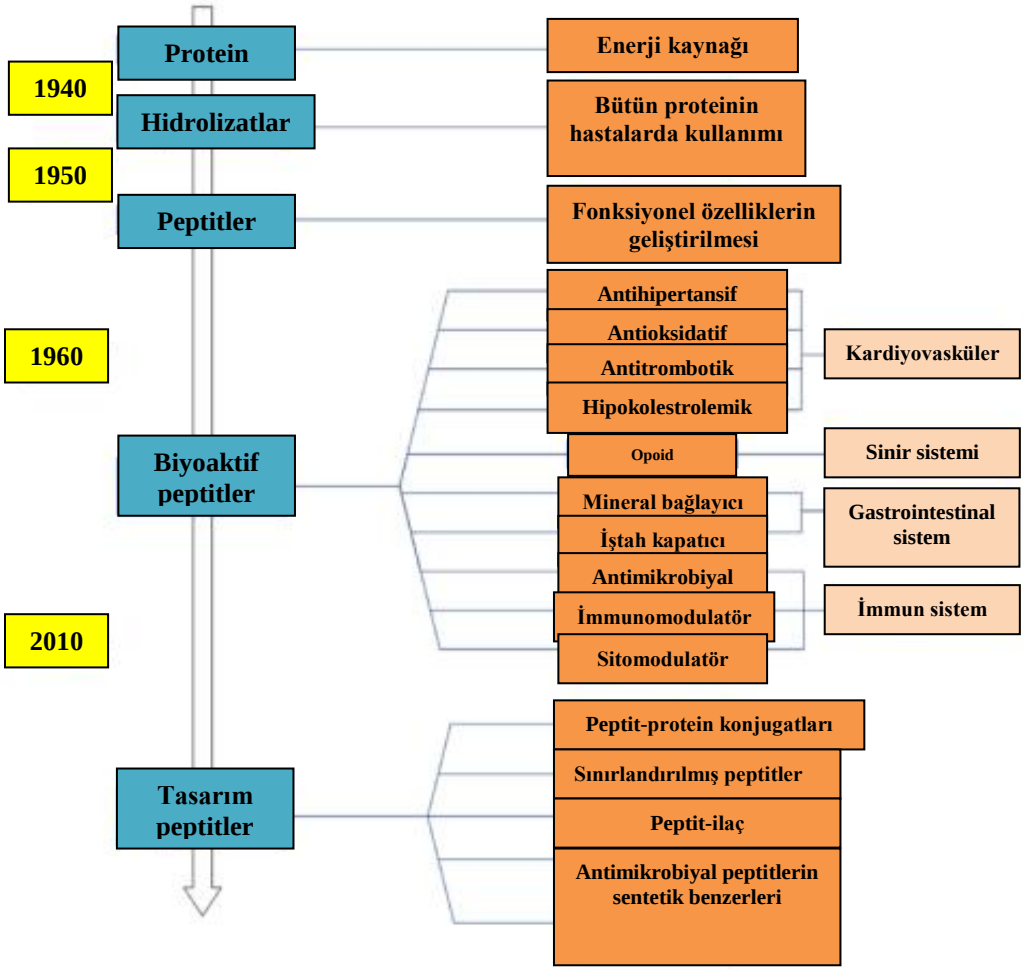
Fonksiyonel gıda araştırmalarındaki son gelişmeler, biyoaktif peptitler dahil biyoaktif bileşiklere olan ilginin artmasına neden olmuştur. "Peptit" kelimesi, "küçük sindirilebilir" veya "sindirilmiş" olarak tercüme edilen Yunanca terimden gelir (Kadam ve diğ., 2015). Peptitler, iki veya daha fazla amino asidin birleşmesi ile oluşur ve ribozomal ve ribozomal olmayan olarak sınıflandırılabilmesinin yanısıra biyoaktivitelerine göre de sınıflandırılabilir (Kadam ve diğ., 2015).

Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonlarını veya durumlarını değiştirebilen ve sonuçta sağlığı olumlu yönde etkileyebilen spesifik protein fragmanlarıdır (Korhonen & Pihlanto, 2006). Aynı zamanda genellikle enzimatik hidroliz ile üretilen ve bağırsak enterositleri tarafından kan akışına ulaştırılması için emilen, vücut fonksiyonları ve

koşulları üzerinde yararlı biyolojik aktivite uygulayan kısa zincirli peptitlerdir (Sayari ve diğ., 2016). Biyoaktif peptitler 2-20 amino asit içerir ve düşük moleküler ağırlığa (<6000 Da) sahiptir, ancak bazı durumlarda 20'den fazla amino asitten de oluşabilir (Erdmann ve diğ., 2008). Tüm yaşamın temel bileşenleri olan proteinler; her organizmada, farklı amino asit sekanslarına sahip çeşitli peptitlere türetilebilen çok sayıda farklı proteoma sahiptir. Bu proteinlerden, kaç ve farklı peptit elde edilebileceği konusunda bir sınır yoktur ve bu da çoklu biyoaktivite sebep olabilir (Ovando ve diğ., 2018).

Peptitlerin biyolojik aktivitesi ilk olarak Mellander tarafından 1950'de rapor edilmiştir. Son yirmi yılda biyoaktif peptit tanımlama ve karakterizasyonuna büyük ilgi duyulmaktadır, bu sebeple araştırmacılar yeni kaynakları, ekstraksiyon yöntemlerini araştırmaya ve biyoaktif peptitlerin sağlık yararlarını değerlendirmeye devam etmektedir (Sun, 2013).

Ayrıca son çalışmalar proteinlerdeki peptit sekansının ana protein dizisi içinde inaktif olduğunu ve peptitlerin enzimatik hidroliz ile salındıktan sonra biyoaktif özellikler verdiğini göstermiştir (Agyei & Danquah, 2011).



Şekil 1.3: Peptitlerin gelişimi ve uygulamaları ((Kadam ve diğ., 2015)'ten uyarlanmıştır).

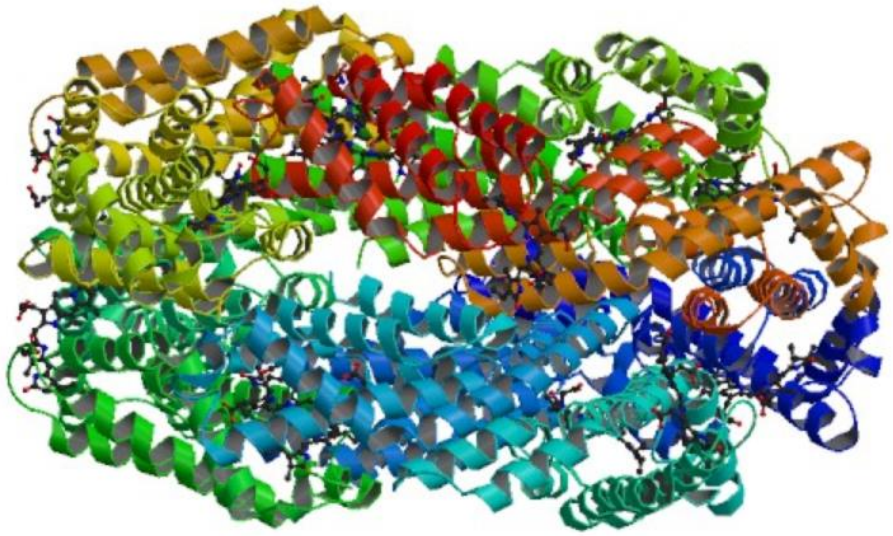
Biyoaktif peptitler, yılda 58 milyon kişiyi etkileyen dünya çapında kronik hastalık salgınının azaltılmasına yardımcı olma potansiyeline sahiptir. Şu anda fonksiyonel proteinler ve peptitler pazarı 75 milyar $ / yıl değerindedir ve ayrıca peptit bazlı ilaç satışları hızla büyümekte ve yıllık 20 milyar dolarlık satışla küresel ilaç pazarının %2'sine denk gelmektedir (Sun, 2013).

Biyoaktif peptitler, özellikle sahip olduğu hormon, nörotransmitter ve nöromodülatör rolleri ve metabolik parçalanma ürünlerinin düşük toksisitesi özellikleri sebebiyle fonksiyonel gıdalara ve nutrasötiklere dahil olmak için büyük bir potansiyele sahiptir (Bellmann-Sickert & Beck-Sickinger, 2010). Ancak bu özelliklere karşın kolay degrade olması, ve kimyasal olarak kararsızdır, *in vivo* yarılanma ömürleri kısadır ve düşük oral biyoyararlanımları ve suda düşük çözünürlüğe sahip olması gibi zorluklara sahiptir (Kadam ve diğ., 2015).

Çeşitli çalışmalarda hipogin (yer fıstığı), angularin (adzuki fasulyesi), lunasin (soya fasulyesi ve arpa) gibi biyoaktif peptitlerin tıbbi özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir ve bunla beraber hayvan kaynaklarından gelen biyoaktif peptitlerin de, antihipertansif, antioksidan, antimikrobiyal ve antiproliferatif aktivite gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir (Redwan, 2009). Aynı zamanda toplam küresel biyolojik çeşitliliğin yarısını sağlayan deniz ortamının sahip olduğu kaynaklar da güçlü biyoaktif peptitlerin bulunması için uygun ortam sağlamaktadır ve su canlıları kaynaklı biyolojik olarak aktif olan peptitlerin, enzim inhibisyonu, mineral bağlanması, immünomodülatör, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, hipokolesterolemik ve antihipertansif eylemleri içeren bir dizi işlevselliğe sahip olduğu bildirilmektedir (S. K. Kim & Wijesekara, 2013).

Yüksek protein içeriği ve terapötik özellikleri ile bilinen siyanobakteri *Spirulina*, potansiyel bir biyoaktif peptit kaynağı olarak araştırılmıştır. *Spirulina*'dan türetilen bazı biyoaktif peptitler, antimikrobiyal, antialerjik, antihipertansif, antitümör ve immünomodülatör özellikler gibi belirli sağlık yararları sunma yetenekleri nedeniyle araştırılmaktadır. Potansiyel olarak, *Spirulina* türevi peptit fraksiyonları gıdalarda ve farmasötiklerde nutrasötik bileşenler olarak uygulanabilir (Ovando ve diğ., 2018).

Siyanobakteriler gibi ökaryotik canlı grupları bir protein kompleksi olan fikobiliproteinleri oluşturur. Fikobiliproteinler bir makromolekül olan fikobilizomun küçük bir grubudur ve en yaygın sınıfları hepsi a ve b protein alt birimleri tarafından oluşturulan ve çift bağlarının düzenlenmesinde farklı olan farklı izomerik lineer tetrapyrol prostetik grupları (bilinmeyen kromofor) taşıyan allofikosiyanin (allophycocyanin), fikosiyanin (phycocyanin) ve fikoeirtrin (phycoerythrin)'dir. Fikosiyanin, sırasıyla 17.000 ve 19.500 Da'lık iki farklı a ve b protein alt biriminden oluşur, bir bilinmeyen kromofor, alt birime (a 84) ve iki b alt birimine (b 84, b 155) bağlıdır. Mikroalg hücresel biyokütleden bir dondurma çözme işlemi ile elde edilebilir ve çeşitli yöntemlerle saflaştırılabilir (Gershwin & Belay, 2007). Ayrıca püskürtmeli kurutma yöntemiyle *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyanin ile taze *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyanin benzer antioksidan aktiviteye sahiptir. Ayrıca fikosiyanin, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe eder, ayrıca bunları çeşitli test sistemlerinde temizleyebilir ve güçlü bir antioksidan aktivite gösterir (Gershwin & Belay, 2007).



Şekil 1.4: *Spirulina* spp.'dan alınan fikosiyaninin 3 boyutlu yapısı (Satyanarayana ve diğ., 2008).

1.2.2.2 Sağlık üzerine etkileri

İyi beslenme; sağlık, optimal büyüme ve gelişme ve hastalıkların önlenmesi için hayati önem taşımaktadır. Besin maddeleri insanın fizyolojik fonksiyonlarının altında yatan moleküler mekanizmaları etkileşime sokabilir ve modüle edebilir.Bu bilginin ortaya çıkması sonucu nötrasötiklere ilgi artmıştır. İnsan vücudu, ihtiyaçları gerekli vitaminler, mineraller, enzimler ve diğer besinler ile desteklenirse kendini iyileştirebilir. Şifa verici ve koruyucu sağlık özelliklerine sahip birçok gıda vardır.

Güçlü etkiye sahip, geniş kapsamlı ve çeşitli besin gruplarından biri *Spirulina*'dır. *Spirulina* iyi bilinen bir terapötik kaynaktır; anemi, hepatotoksisite, kardiyovasküler hastalıklar, hiperglisemi, hiperlipidemi, immün yetmezlik, inflamatuar süreçler, çeşitli kanser türlerinde bağışıklık direncinin arttırılması, kolesterol, HIV ve viral hastalıkların tedavisinde etkinliğinin kanıtlandığı *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalar vardır (Belay, 2002).

Spirulina pek çok biyoaktif molekül içerdiğinden, çeşitli bozuklukların giderilmesinde terapötik olarak yardımcı olabileceği çeşitli tariflerde kullanılması için önemli bir potansiyele sahiptir.

Bulaşıcı olmayan ama hayati önem taşıyan ve 2001 yılında dünyadaki toplam 56,5 milyon ölümün yaklaşık%60'ına sebep olan diyabet, hipertansiyon ve kalp hastalığı

gibi kronik hastalıklar yaşam tarzındaki değişiklikler ile iyileştirilebilir. Bu konuda özellikle diyetle ilgili yapılacak değişiklikler son derece önemlidir (Gershwin & Belay, 2007).

Son yıllarda, dejeneratif hastalıklarla mücadele edebilecek yeni ilaçlar ve fonksiyonel gıda ürünleri üzerine yapılan araştırmalar artmıştır. Doğal kaynaklar bu bağlamda özellikle caziptir ve genellikle bu yeni ürünlerin birçoğu, yeni ilaçların ve nutrasötiklerin ve fonksiyonel gıda bileşenlerinin keşfinde umut verici biyoaktivitelere ve olağanüstü avantajlara sahip olan peptitler gibi küçük moleküllerdir (Nooshkam & Madadlou, 2016).

Mavi-yeşil algler olan *Spirulina* bugün büyük bir nutrasötik fenomendir ve bu konuda yapılan dünya çapında tıbbi araştırmalar, *Spirulina*'nın eşsiz besin karışımıyla (kaliteli proteinler, dengeli yağ asidi profili, antioksidan vitaminler ve mineraller) diyabet, artrit, anemi, kanser ve benzeri birçok sağlık problemiyle mücadeleye yardımcı olduğunu ortaya koymuştur (Gershwin & Belay, 2007).

Dünya çapında diyabet vakalarının sayısının 150 milyon civarında ve bu sayının 2025 yılına kadar iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (Nogoy ve diğ., 2003). Diyabet tip 2 hastaları ile yapılan bir çalışmada elde edilen veriler, 2 g / gün düzeyinde *Spirulina* ile takviye edilen hastaların glisemik statüsünde 4 ay boyunca düzenli ve önemli bir iyileşme olduğunu açıkça gösterilmiştir (Gershwin & Belay, 2007). Ayrıca diyabetle ilgili olarak yapılan bir başka çalışmada, ham *Spirulina* ve *Spirulina*'nın insülin benzeri proteini ile tedavi edilen diyabetik sıçanların kan glikozu, glikosile hemoglobin, serum glutamik oksaloasetik transaminaz, serum glutamik piruvik transaminaz, alkalin fosfataz gibi değerlerinin normalleştiği gözlenmiştir (Anwer ve diğ., 2013).

Spirulina'nın çeşitli ilaç metabolize edici ve detoksifiye edici enzimlerinin yanı sıra sahip olduğu antioksidan enzimlerinin de modülatör etkisi vardır. Yapılan bir çalışmada, 7 haftalık İsviçre albino farelerinin karaciğerinde 250 ve 500 mg/kg *Spirulina*'nın ilaç metabolizması incelendi ve kanserojen detoksifikasyon etkisi olduğu belirlenmiştir (Dasgupta ve diğ., 2001).

Bronşiyal astım, akciğerleri ve akciğerlere hava sağlayan hava yollarını etkileyen bir hastalıktır. Epizodik intratorasik hava yolu tıkanıklığı, hava yolu aşırı duyarlılığı ve hava yolu inflamasyonu ile karakterize en sık görülen solunum bozukluğudur. Bu nedenle antioksidan besin galaksisi ile *Spirulina*, solunum astarındaki zararlı hasar ve iltihapla mücadele için etkili bir terapötik mod olabilir. Astım hastaları ile yapılan bir

çalışmada; hastaların protein durumu, pulmoner fonksiyon ve IgE durumundan elde edilen olumlu sonuçlardan, *Spirulina*'nın astım tedavisinde terapötik ve diyet takviyesi olarak ilaca dahil edilebileceği ve uzun vadede bu sonuca varılabilir. *Spirulina* sadece astımı kontrol etmeye yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda tedavisinde ilaç ihtiyacını da azaltır (Gershwin & Belay, 2007).

Karaciğer, akciğer ve beyin gibi çeşitli dokularda mitokondride oksijen moleküllerinin kısmi azalması sebebiyle, süperoksit anyon (ROS) hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi zararlı serbest radikaller üretilir. *Spirulina*'nın en yaygın peptit moleküllerinden olan fikosiyanin bu radikalleri temizleyebilmektedir. Yapılan bir kemilüminisans deneyinde hem doğal fukosiyaninin hem de indirgeyici formunun hidroksil radikallerini uzaklaştırdığı gösterilmiş ve fikosiyaninin insan eritrositlerini peroksil radikallerinin neden olduğu lizise karşı koruyabildiği bildirilmiştir (Lissi ve diğ., 2000). Ayrıca aynı kaynakta fikosiyaninin, bir antioksidan olan trolokstan yaklaşık 16 kat daha verimli ve askorbik asitten de yaklaşık 20 kat daha etkili olduğu kanıtlanmıştır.

İnsan sağlığı için ROS'un aracılık ettiği lipit peroksidasyonunun, hücre zarlarında yıkım ve hasarın önemli bir nedenidir. Bunun sebebi, yüzlerce yağ asidi yan zincirinin, yapısal bütünlüğünü ve biyokimyasal fonksiyonlarını değiştiren lipit peroksitlere dönüştürülmesine neden olabilmesidir. *Spirulina*'nın önemli bir antioksidan bileşeni olan fikosiyanin ile yapılan bir çalışmada, 200 mM konsantrasyonundaki fikosiyanin ile yapılan tedavi sonrası sıçan karaciğerinde lipit peroksitlerindeki artışı %95 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (Piero Estrada ve diğ., 2001).

Serbest radikal üretim mekanizması yoluyla nefrotoksisite ve kardiyotoksisiteye neden olan bazı çeşitli ilaçlar vardır. Örneğin, siklosporin ile indüklenen nefrotoksisite, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite, gentamisin kaynaklı nefrotoksisite ve sisplatin kaynaklı nefrotoksisite önemli klinik zorluğa sebebiyet verir. ROS üretimi, bu ilaçların neden olduğu nefrotoksisitede rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda; *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyanin ile yapılan ön tedavi sonucu, sıçanların cisplatin kaynaklı nefrotoksisiteden korunduğu (Kuhad ve diğ., 2006) ve doksorubisine bağlı ROS hücrelerinin önemli ölçüde azaldığı kanıtlanmıştır (Khan ve diğ., 2006).

Nefrotik sendrom, günde 3.5 g / 1.73 m^2'den daha fazla proteinin idrarla atıldığı klinik bir durum olarak tanımlanır. Bu bozukluk plazma proteinlerinin aşırı filtrasyonunun altını çizen glomerüler kılcal duvarın seçici bariyerlerinin değişimindeki veya boyutundaki kusurlar, immünolojik bozukluklar, toksik yaralanmalar, metabolik

anormallikler, biyokimyasal kusurlar ve vasküler dahil olmak üzere çeşitli hastalık süreçlerinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Yapılan bir çalışmada *Spirulina* ile takviye edilen deney grubu hastaların, kontrol grubundaki hastalara kıyasla daha iyi bir şekilde iyileşmeye yardımcı olduğu söylenebilir (Gershwin & Belay, 2007).

Yapılan bir çalışmada, anemi hastalığına sahip ergenlik yaşlarındaki kızlara 30 g'lık bir spreyle kurutulmuş *Spirulina* tozunun 30 günlük bir süre boyunca takviye edilmesinin, hemoglobin düzeylerinin iyileştiği gibi demir metabolizması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve ayrıca 50 gün boyunca günde 1 g spreyle kurutulmuş *Spirulina*, yüksek oranda demir formu içerir, ile takviye edilen okul öncesi çocukların hemoglobin seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Dünyada yaygın olan demir eksikliği anemisi ile mücadelede kullanılabilir (Gershwin & Belay, 2007).

Kullanım alanları

Spirulina, büyük miktarlarda bitkisel protein (%70 kuru ağırlık), karotenoid (4000 mg/kg), omega-3 ve omega-6, nadir esansiyel yağ asidi olan gama linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerini; sülfolipidler, glikolipidler, polisakkaritler, provitaminler; A vitamini, E vitamini, çeşitli B vitaminleri gibi diğer besinleri; ve kalsiyum, demir, magnezyum, manganez, potasyum, çinko ve selenyum gibi mineralleri içerir. Aynı zamanda, fikobiliprotein ailesinin bir fotosentetik pigmenti olan fikosiyanin gibi zengin ve ucuz bir pigment kaynağıdır. Fikosiyanin, gıda endüstrisinde yaygın olarak bir gıda renklendirici, emülgatör, koyulaştırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanılır. Biyomedikal araştırmalarda kozmetik renklendiricileri ve floresan belirteçler olarak da kullanılabilirken, çeşitli araştırmalar, fikosiyanin, selenyum, karotenoidler ve yağ asidi γ-linolenik asit (GLA) dahil olmak üzere çeşitli *Spirulina* bileşenlerinin önemli antioksidan ve radikal süpürücü özelliklere sahip olduğunu doğrulamıştır (Gershwin & Belay, 2007). Tüm bunlar da göstermektedir ki *Spirulina platensis'*den elde edilen biyoaktif peptitler pek çok kullanım alanına sahiptir.

Ayrıca zengin bir protein, vitamin, amino asit, mineral ve diğer besin kaynağı olan ve püskürtülerek kurutulmuş *Spirulina* çeşitli tariflere eklenerek sağlık açısından çok faydalı farklı lezzetler hazırlanabilir (Gershwin & Belay, 2007).

Spirulina sahip olduğu biyoaktif peptitlerin bilinmediği dönemlerde dahi sağlığa faydasından dolayı kullanılmaktaydı. Ana protein kaynağı olarak kullanıldığı bu

dönemlerin ardından insanlar tarafından yem ve yem katkı maddesi olarak da kullanılmaya başlandı. Sadece sahip olduğu peptitlerden dolayı değil içeriğindeki pigmentlerden dolayı da kümes hayvanlarında kullanılabilmektedir. Özellikle yumurta sarısında renk yoğunluğu artmaktadır (Avigad Vonshak, 1996).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde ihtiyaç duyulan düşük maliyetli ve kaliteli yem olarak *Spirulina* kullanılabilmektedir. Mikroalgler balıkların, kabukluların ve diğer pek çok organizmanın besin zincirinde doğal bir besin kaynağıdır (Avigad Vonshak, 1996). Diğer taraftan, *Spirulina* ile formüle edilmiş yemler, birçok türün büyüme oranını arttırır. Yemin lezzetini arttımasının yanı sıra *Spirulina* ile beslenen balıkların daha az karın yağına sahip olduğu da bildirilmiştir (Avigad Vonshak, 1996). *Spirulina*, besin değerine ek olarak kozmetik uygulamalarında da kullanılmaktadır (S. K. Kim ve diğ., 2008).

Biyoaktif peptitler metabolik düzenleme ve modülasyon sürecinde önemli bir rol oynadıkları için, özellikle bağışıklık uyarıcıları olarak işlev gören bileşenlerle nutrasötikler ve fonksiyonel gıda alanlarında kendilerine yer bulmaktadırlar (Samarakoon & Jeon, 2012).

Spirulina'dan elde edilen anti-enflamatuar, anti aterosklerotik, anti-alerjik ve antihipertansif peptitler; enflamatuar hastalıklar, hipertansiyon tedavisi için veya yeni alerjik reaksiyon inhibitör olarak fonksiyonel gıdalarda ve/veya farmasötiklerde faydalı bir bileşen olarak kullanılabilir (Lu ve diğ., 2010). Ayrıca demir-kenetleme aktivitesine sahip biyoaktif peptitler de, demir takviyesi olarak kullanılabilir (N. H. Kim ve diğ., 2014). Diğer bir taraftan özellikle peptit bazlı UV koruyucuları, akne ve çeşitli cilt tedavilerinde kullanılan ilaçlarda kullanılmaktadırlar (Danquah & Agyei, 2012). Biyoaktif peptitlerin çok yönlülüğü ve çok fonksiyonlu olması sebebiyle antimikrobiyal ve böcek ilaçları gibi tarımsal uygulamalarda kullanılabilmektedirler (Sun, 2013). Ayrıca, ambalajlama ve muhafaza etme gibi gıda uygulamalarında da kulllanılabilmektedirler (Samarakoon & Jeon, 2012).

1.2.2.3 Elde edilme yöntemleri

Biyoaktif peptitler, protein bakımından zengin gıdaların tüketilmesinden sonra insan sindirimi sırasında salınabilir olsa da, üretilen peptitlerin tipi ve miktarı kontrol edilememekte ve önemli terapötik etkiler üretmek için yetersiz olabilmektedir; dolayısıyla biyoaktif peptit konsantrelerinin üretimine olan ihtiyaç mevcuttur (Gauthier ve diğ., 2006).

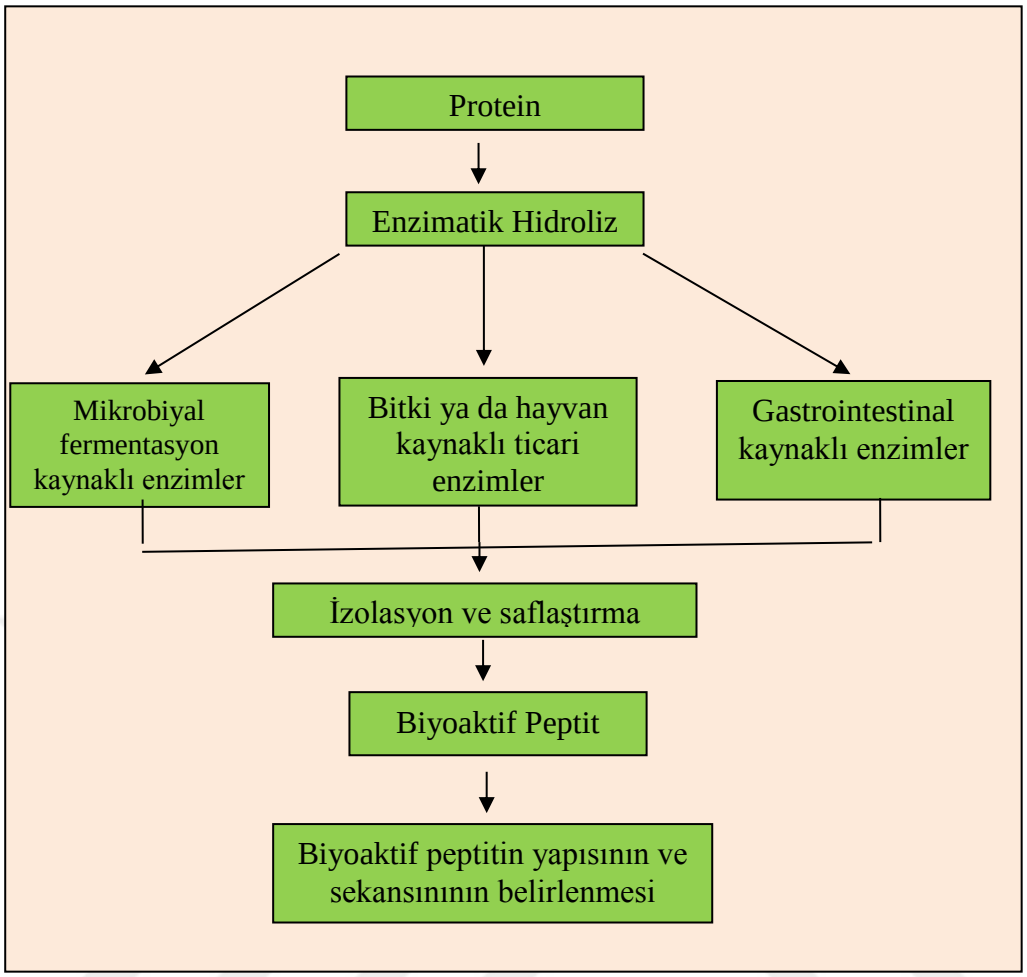
Biyoaktif peptitler biyokütleden biyoaktif peptit fraksiyonları, hücre lizizi ve protein ekstraksiyonu, enzimatik hidroliz, potansiyel biyoaktivite taraması, fraksiyonlama ve saflaştırma dahil olmak üzere bir dizi işlemle elde edilebilir (Ovando ve diğ., 2018). En yaygın olarak kullanılanlar, mikro organizmalardan türetilen sindirim enzimleri ve gıda proteinlerinin fermantasyonu ile enzimatik hidrolize dayanır (S. K. Kim & Wijesekara, 2013). Bununla birlikte, kimyasal hidrolize veya alt kritik su hidrolizine dayanan diğer yöntemler de son yıllarda yaygın olarak araştırılmıştır. Ana protein içindeki aktif olmayan veya gizli biyoaktif peptit formu proteoliz ile aktive edilebilir (Ryan ve diğ., 2011).

Biyoaktif peptitler; gıda proteinleri, soya, puls bitkileri, süt ve peynir gibi fermente ürünler, sığır kolostrumu, sığır proteini, böcekler, omurgalılar ve omurgasızlar, mantar, bakteri, deniz organizmaları ve mikroalg gibi çok çeşitli doğal protein kaynaklarından elde edilebilir (Ovando ve diğ., 2018).

Aslında siyanobakteri olarak sınıflandırılan, canlılık için gerekli tüm amino asitleri içeren zengin bir protein çeşitliliğine ve karotenoidler, yağ asitleri ve minerallerde tam bir besinsel bileşime sahip olan *Spirulina*, biyoaktif peptitler için mükemmel bir kaynaktır (Belay, 2002). *Spirulina*'dan elde edilen peptitler için antimikrobiyal, anti-alerjik, antihipertansif ve immünomodülatör aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler pek çok çalışmada bildirilmiştir (Gibbs ve diğ., 2004).

Biyoaktif peptitler, Şekil 1.6'da şematize edildiği gibi proteinlerin çeşitli enzimlerle hidroliz edilmesiyle üretilebilir. Elde edilen ürünlerde organik çözücülerin veya toksik kimyasalların bulunmaması nedeniyle, özellikle gıda ve ilaç endüstrilerinde enzimatik hidroliz kullanımı özellikle tercih edilmektedir (S. K. Kim & Wijesekara, 2010).

Hedeflenen biyoaktivite için uygun enzimlerin araştırılması ve hidrolizin optimize etmek zorunludur. Spesifik bir biyoaktif peptitin araştırılması veya üretimi esnasında; yüksek verim (hidroliz derecesi) için, proteolitik enzimin aktivitesi ve hedef biyoaktivite maksimuma çıkarılmalı ve bu sebeple; uygun proteolitik enzimin seçilmesi ve optimal fizikokimyasal koşulların gerçekleştirilmesi önemlidir (Ovando ve diğ., 2018).



Şekil 1.5: Biyoaktif peptit eldesi (Agyei & Danquah, 2011).

Bu enzimler bitkilerden, mikroorganizmalardan ve hayvanlardan elde edilebilir ve optimal pH ve sıcaklıklarında çalışır. Bitki ve hayvan kaynaklı yaygın olarak kullanılan enzimler; α-kimotripsin, papain, nötraz, termolizin, pepsin, alkalaz, pronaz, karboksipeptitaz A ve tripsindir (S. K. Kim & Wijesekara, 2010). Yaygın olarak kullanılan mikrobiyal enzimler ise; Bacillus spp, Bifidobacterium ve laktik asit bakterilerinden elde edilmektedir (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Enzimler tek olarak kullanılabilirken, bir dizi enzim de art arda sıralı şekilde de uygulanabilir. Aynı zamanda enzimler immobilize edilerek de kullanılabilir, böylece daha kontrollü koşullar altında hidrolizasyon gerçekleştirilebilir (Agyei & Danquah, 2011). Ayrıca başka bir yöntem olarak da enzim hidrolizinden önce hücre lizizi de gerçekleştirilebilir (Vo ve diğ., 2013).

Biyoaktif peptit elde etmenin bir başka yolu olan fermantasyonda ise, laktik asit bakterileri gibi bazı mikroorganizmalar kullanılır ve bu enzimatik hidroliz işleminden daha ucuz olabilir. Bununla birlikte, fermantasyon işleminde, kontrolü sağlamak adına

organizmaların büyüme parametrelerini kontrol etmek önemlidir (Singh ve diğ., 2014). Ayrıca bu yöntemle ilgili olarak literatürde 2 farklı patent de mevcuttur (Ovando ve diğ., 2018).

Spesifik peptitler elde edildikten sonra, rutin olarak biyoaktif fraksiyonlar üretebilmek için sindirim ve saflaştırma yöntemleri geliştirilmelidir. Biyoaktif peptitleri izole etme ve saflaştırma basamakları için yaygın olarak ultrafiltrasyon, iyon değişimi, jel filtrasyon teknolojileri ve sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılmaktadır (Chabeaud ve diğ., 2009). Endüstriyel biyoteknoloji proseslerindeki ayırma ve saflaştırma aşamalarının sermayenin ve işletme maliyetlerinin%70'ini oluşturabilmektedir ve bu sebeple biyoaktif peptitlerin zaman ve maliyeti azaltmak için optimize edilmiş koşullar altında izole edilmesine yönelik metodolojiler üzerinde araştırmalar devam etmektedir; elektro-membran filtrasyonu, biyoaktif peptitler gibi kuvvetle yüklü biyomoleküllerin izolasyonu için alternatif bir yöntemdir, geleneksel membran filtrasyonunu elektroforez ile birleştirilerek membran filtrasyonundan daha seçici ve kromatografiden daha az maliyetli hale getirilebilir. Ek olarak, zarın tipi, elektrik alan kuvveti, hidrolizatın tuzlanması ve hidrolizat konsantrasyonu gibi bazı çalışma parametreleri, ürün aktarımını ve ayırma oranını geliştirmek için manipüle edilebilir (Agyei & Danquah, 2011).

Yapılan bir çalışmada S. *maxima*'dan türetilen anti-enflamatuar, anti-aterosklerotik ve antialerjik peptitlerin saflaştırılması için yapılan fraksiyonlama işleminde 3, 5 ve 10 kDa moleküler ağırlığa sahip ultrafiltrasyon membranları kullanılmıştır (Vo ve diğ., 2013). Yapılan bu çalışmada elde edilen fraksiyonlar, hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC), jel permeasyon kromatografisi, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ve anyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış biyoaktif peptitler liyofilize edilmiş ve Q-TOF kütle spektrometresi kullanılarak amino asit dizisi belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise S. *platensis* kullanılmış ve S. *platensis*'in alkalaz hidrolizatlarının ultrafiltre edildiği ve peptitlerin jel filtrasyonu ve ters faz HPLC ile saflaştırıldığı bildirilmektedir (Lu ve diğ., 2010).

Yapılan bir başka çalışmada ise *Spirulina* peptitlerinin demir-kenetleme aktivitesine bakılmış ve 3 kDa'nun altındaki peptitleri izole etmek için ultrafiltrasyon işlemi yapılmıştır (N. H. Kim ve diğ., 2014). Böylece, ortalama 110 Da'lık bir moleküler ağırlık göz önüne alındığında, yaklaşık 30 amino aside sahip peptitler elde edilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada izolatlar anyon değişim kromatografisi ve jel permeasyon

kromatografisi kullanılarak fraksiyonlara ayrılmış ve peptit sekansları, tandem kütle spektrometrisi ile belirlenmiştir. Endüstriyel ölçekte kullanılan saflaştırma teknikleri de ultrafiltrasyon, iyon değişimi, nanofiltrasyon, elektro membranlar ve sıvı kromatografisidir (Agyei & Danquah, 2011).

Elde edilen çoğu antimikrobiyal peptit kısa, hidrofobik ve katyonik yapıdadır (Hancock & Sahl, 2006). Biyoaktif peptitlerin biyoaktivitesinde birincil dizinin ötesinde, ikincil ve üçüncül yapısal modifikasyonlar da hayati bir rol oynar. Biyoaktif bir peptitin fonksiyonel özelliği, amino asit kompozisyonu ve sekansına spesifiktir (Korhonen & Pihlanto, 2006). Yani benzersiz üç boyutlu (3D) yapısı ile belirlenir; ve ayrıca, üçüncül yapı yerine ikincil yapı, peptitlerin bağlanma özelliklerini etkileyen baskın faktördür (Kaur & Garg, 2007). X-ışını kristalografisi, kütle spektroskopisi ve NMR gibi deneysel yöntemlerin yanı sıra QSAR (Kantitatif Yapı-Etkinlik İlişkisi), Robetta, PepLook ve PEPstr gibi yöntemler; fonksiyonel özelliklerin bulunduğu biyoaktif peptitlerin 3D yapısını incelemek için kullanılabilir (Agyei & Danquah, 2011).

Biyoaktif peptitleri tarama ve karakterizasyon adımlarının kolaylaştırılabilmesi için omik tabanlı analitik stratejiler, proteomik ve peptitomik araçlar kullanılabilmektedir (Saavedra ve diğ., 2013).

Bunlara ek olarak elde edilen biyoaktif peptitlerin etkilerini ölçmek için kontrollü koşullar altında bir *in vivo* veya *in vitro* doku veya hücre modeli kullanılarak uygulanan biyolojik analizler gerçekleştirilmelidir. Biyolojik deneyler, biyoaktif bir peptitin beklenen fonksiyonlarını tanımlamak ve ölçmek için yararlıdır (Ovando ve diğ., 2018).

1.2.2.4 Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu

Elde edilen ve saflaştırma işlemlerinden geçirilen biyoaktif peptitler vücut içinde hedeflenen bölgelere güvenli bir şekilde ulaştırılmalıdırlar. Oral yolla vücuda alımları sonucu düşük geçirgenlik sebebiyle tam olarak gerçekleştirilemeyen biyoyararlanımın gerçekleştirilebilmesi için mikrokapsülleme, nanoparçacıklar ve enkapsülasyon gibi çeşitli taşıyıcılar kullanılabilir (Ovando ve diğ., 2018). Enkapsülasyon, büyük ölçüde farmasötik, kozmetik, nutrasötik ve gıda ürünlerinde kullanılan teknolojik bir süreçtir. Genellikle biyoaktif peptitlerin, amaca da bağlı olarak, işleme ve depolama stabilitesini arttırmak, biyoyararlanımı arttırmak, kontrollü serbest bırakmak,

çözünürlüğü arttırmak veya gıda endüstrisi durumunda hoş olmayan lezzetleri maskelemek için uygulanabilir (Ersus & Yurdagel, 2007).

Enkapsülasyonun temel prensiplerinden biri de; aktif maddenin daha yavaş salınmasını sağlamaktır. Bu açıdan yapılan bir çalışmada *Spirulina* sp.'dan elde edilen fenolik ekstraktı, serbest ve lipozomla kapsüllenmiş halde incelenmiş; yapı-aktivite ilişkisi ve fenolik bileşikler ile membran arasındaki etkileşim dikkate alınarak karşılaştırılmış ve tartışılmıştır. Bu deneyde, enkapsüle edilmemiş fenolik ekstraktın Fusarium graminearum için %92 inhibisyon oranı gösterdiği ve lipozom içine %8 oranında fenolik ekstrakt eklenerek uygulandığında ise inhibisyonun 1.5 kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca bu sistem yavaş salımlı bir çalışma mekanizmasına sahip olduğundan; iknci metabolitlerden olan mikotoksinlerin üretiminin azalmasına da neden olmuştur (Pagnussatt ve diğ., 2016).

Enkapsülasyon işleminin kullanılmasının bir başka nedeni ise; biyoaktif peptitlerin termal bozunmasını önlemek ve sahip olduğu renklendirme yeteneğini muhafaza etmektir. Bu konuda 2020 yılında yapılan bir çalışmada farklı oranlarda saf trehaloz ve trehalosemaltodekstrin karışımlarından oluşan farklı enkapsülasyon materyalleri kullanılarak *Spirulina* enkapsüle edilmiş ve yapılan deneyde enkapsülasyon sonrası fikosiyaninin %89'luk bir artışk sergileyerek yüksek bir taşıma kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir (Faieta ve diğ., 2020). Bu da enkapsülasyon işleminin; *Spirulina* ekstraktının termal bozunmasını önlemede ve renklendirme yeteneğini muhafaza etmede daha etkili olduğunu göstermektedir.

Enkapsülasyon çalışmalarını etkileyen temel faktörler; film oluşturucu malzemelerin ve/veya kapsülleme ajanlarının seçimi, işleme ve depolama sırasında sistemlerin spesifik uygulamaları ve istenen performans ve kararlılıktır. Enkapsülasyon için kullanılan kapsül materyali seçiminde, materyalin peptitler üzerindeki etkisi önemlidir ve iyi bilinen materyaller seçilmelidir. Özellikle karbonhidratlar, iyi bilinen film oluşturma özellikleri, amorf matrisler geliştirme yeteneği, maliyet etkinliği ve gıda formülasyonları için uygunluğu nedeniyle kapsülleme için yaygın olarak kullanılmaktadır. Küçük karbonhidratlar geleneksel kapsülleme uygulamalarında tek başına kullanılmakta ve çevresel stres koşullarına maruz kalan hem yüksek hem de düşük nem sistemlerinde proteinleri stabilize edebilmektedir (Cordone ve diğ., 2015).

Günümüzde tüketicilerin gıda endüstrisinde sentetik renklendiricilerin doğal renklendiricilerle değiştirilmesi konusundaki artan ilgisine rağmen, doğal renklendiricilerin düşük stabiliteleri sebebiyle kullanımları sınırlıdır. Özellikle

şekerlemelerde mavi renk veren ve *Spirulina*'dan elde edilebilen fikosiyaninin formülasyon, işleme ve depolamadaki kararsızlığı sebebiyle kullanımı sınırlıdır. Bu sebeple bu konuda farklı kapsülleme ajanları ile yapılan çeşitli araştırmalar mevcuttur (Martelli ve diğ., 2014).

1.3 Hipotez

Tez kapsamında, ilk aşamada, sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunan ve fonksiyonel gıdalarda kullanım potansiyelleri yüksek olan biyoaktif peptitlerin *Spirulina platensis* ve selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'ten yüksek oranda ve yüksek saflıkta eldesi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş; ve elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri ile *in vitro* biyoyararlılıkları analizlenmiştir. Sonraki aşamada, biyoaktif peptitlerin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesiamacıyla enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiş; enkapsüle biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri ve *in vitro* biyoyararlılıkları analizlenerek; enkapsülasyon öncesi elde edilen sonuçlar ile karşılaştırması yapılmıştır.

Bunlara ek olarak, selenyum mineralinin sağlık üzerine olumlu etkileri ile ilgili literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda piyasada selenyumca zenginleştirilmiş yumurta, yaş/kuru maya gibi ürünler görülmektedir. Benzer olarak, yapılan literatür taramalarına göre selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina* eldesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunurken, selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina'*dan biyoaktif peptit eldesi ile ilgili eksiklik bulunduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis* biyoaktif peptitlerinin enkapsülasyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, tezin başarılı bir şekilde sonuçlanması durumunda, ülkemizde ilk defa antioksidan özellikleri ve *in vitro* biyoyararlılıkları bilimsel olarak ortaya konmuş *Spirulina platensis* biyoaktif peptitlerinin üretimi gerçekleştirilmiş olacaktır.

2. MATERYAL-METOT

2.1 Materyaller

Bu tez çalışması kapsamında 2.1.1-2.1.5 bölümlerinde belirtilen materyaller kullanılmıştır.

2.1.1 Spirulina platensis

Çalışmada; Çukurova Üniversitesi'nden mavi-yeşil bir alg (siyanobakteri) olan *Spirulina platensis*'in M2 suşu 117O941 kodlu ve "*Spirulina platensis*'ten Elde Edilen Biyopeptitlerin Enkapsülasyonu ve Gıda Uygulamaları" adlı proje kapsamında ürettirilerek alınmıştır.

2.1.2 Selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*

Çalışmada; Çukurova Üniversitesi'nden mavi-yeşil bir alg (siyanobakteri) olan *Spirulina platensis*'in M2 suşu sodyum selenit formunda (Na_2SeO_3) farklı oranlarda (20 mg/L ve 30 mg/L) selenyumca zenginleştirilerek 117O941 kodlu ve "*Spirulina platensis*'ten Elde Edilen Biyopeptitlerin Enkapsülasyonu ve Gıda Uygulamaları" adlı proje kapsamında ürettirilerek alınmıştır.

2.1.3 *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit

Çukurova Üniversitesi tarafından üretilen *Spirulina platensis*'in alkalaz enzimi (Alcalaz 2.4 L FG, Novozyme) ile uygun şekilde 5 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen biyoaktif peptitler, saflaştırma işleminden geçirildikten sonra, çalışmalarda kullanılmıştır. *Spirulina platensis*'ten elde edilen saf biyoaktif peptitler analize alınmıştır.

2.1.4 Selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit

Çukurova Üniversitesi tarafından üretilen selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'in alkalaz enzimi (Alcalaz 2.4 L FG, Novozyme) ile uygun şekilde 5 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen biyoaktif peptitler, saflaştırma işleminden

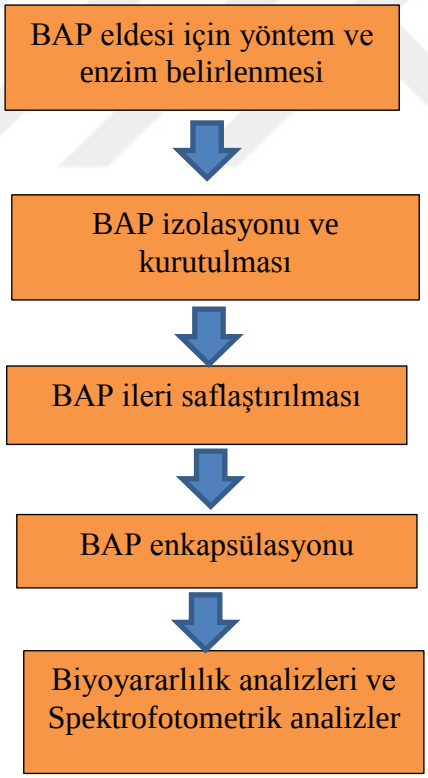
geçirildikten sonra, çalışmalarda kullanılmıştır. Selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'ten elde edilen saf biyoaktif peptitler analize alınmıştır.

2.1.5 Enkapsüle biyoaktif peptit

Metot bölümünde detaylı olarak açıklanan optimizasyon çalışmalarında, distile suda çözdürülerek hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda aljinat çözeltisi (%1,4-1,6), kalsiyum klorür çözeltisi (%2-5) ve %1-5 arasında değişen konsantrasyonda biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enkapsüle formdaki biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri de incelenmiştir.

2.2 Metotlar

Bu tez çalışması kapsamında Şekil 2.1'de gösterildiği sırada ve 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8 ve 2.2.9 bölümlerinde belirtilen metodlar kullanılmıştır.



Şekil 2.1: Tez kapsamında gerçekleştirilen metotlar

2.2.1 Biyoaktif peptit eldesi için yöntem ve enzimin belirlenmesi

Karakterizasyonu belli olan *Spirulina platensis*'ten yüksek oranda biyoaktif peptit (BAP) elde edebilmek için en uygun yöntemin belirlenmesi/ modifiye edilmesi amacıyla literatür araştırmaları yapılmıştır. Öncelikle; Çukurova Üniversitesi aracılığıyla üretilen *Spirulina platensis* çeşitlerinin protein içerikleri belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Tez çalışması için, Vo ve diğ. (2013)'nin yöntemine göre daha güncel olan Yu ve diğ. (2016) ve Wang&Zang (2016)'ın yöntemleri seçilmiştir. Bu yöntemlerin seçimi sırasında metodun BAP eldesinde hızlı ve verimli olması, gıdaya uygulanacağından zararlı ve toksik kimyasallar içermemesi gibi kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Denemeler kontrol *Spirulina* örnekleri ile bu yöntemler çerçevesinde farklı süre ve enzim kombinasyonlarıyla beraber gerçekleştirilmiştir.

Bu iki yöntem kullanılarak, Alkalaz enzimi ile 1 ve 5 saatlik; Flavourzyme enzimi ile ise 5 ve 8 saatlik hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu iki yöntemden elde edilen protein hidrolizatlarının, Kjeldahl metodu ile toplam azot tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

2.2.2 Biyoaktif peptitlerin ultrafiltrasyonla izolasyonu

Optimum koşullarda beş saat alkalaz ile muamele edilerek elde edilen ve yeterli oranda üretilen enzimatik hidrolizatın fraksiyonlarına ayrılması işlemi ultrafiltrasyon metodu ile gerçekleştirilmiş olup, bu amaçla İTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü'nden hizmet alımı yapılmıştır.

3 kDa'dan küçük moleküler boyutta olan peptitlerin diğer boyutlara göre daha iyi antioksidan özellik taşıdığı da son yıllarda yapılan çalışmalarda izlenmiştir. Yu ve diğ., (2016), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikal yakalama aktivitesi bakımından <3 kDa peptitlerin, daha büyük moleküler boyutlu peptitlere göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Ayrıca, Lu ve diğ. (2010)), ACE inhibitörü özellikli biyoaktif peptitler için yaptıkları çalışmada alkalaz ile elde ettikleri hidrolizatların ultrafiltrasyon aşamasında 0-3 kDa arası moleküler ağırlıklı peptitlerle ilgilenmişlerdir. Bunlara dayanarak; ultrafiltrasyonda yalnızca <3 kDa peptitlerle ilgilenilmiştir.

Ultrafiltrasyon işleminde %99 gibi bir verim elde edilir, diğer yöntemlere göre hızlıdır ve çok az yardımcı ekipman gerektirir (Akev, 2019). Ultrafiltrasyon işlemi Vo ve diğ. (2013)'nin uyguladığı yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Enzimatik

hidrolizatlar, saf su ile seyreltilmiştir ve ultrafiltrasyon membranı kullanılarak 3 kDa molekül ağırlığı sınırı ile peptitlerin ayrımı sağlanmıştır. Ultrafiltrasyon işlemi uygulandıktan sonra; <3 kDa molekül ağırlığında olan moleküller ve 3 kDa'luk membrandan geçmeyen moleküller olarak iki ayrı fraksiyon elde edilmiştir.

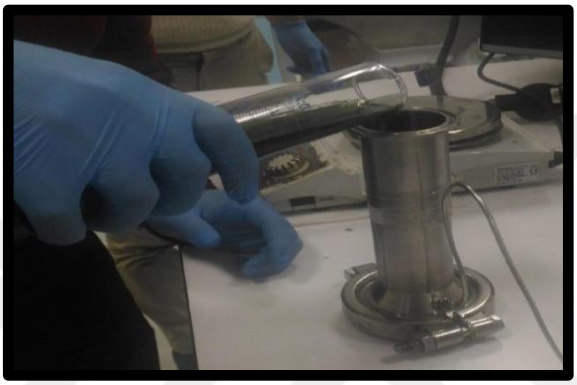


Şekil 2.2: Ultrafiltrasyon işleminde kullanılmak üzere temin edilen filtre.

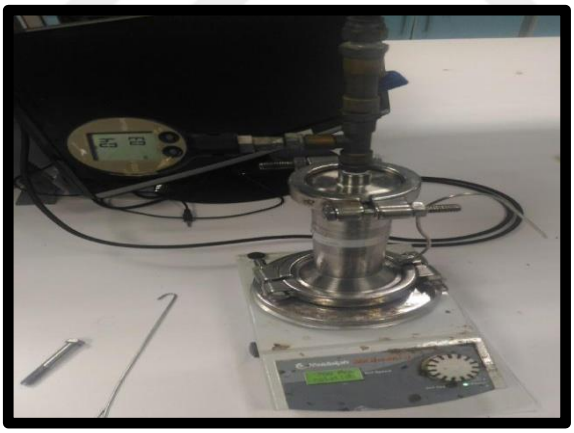
(a)



(b)



(c)



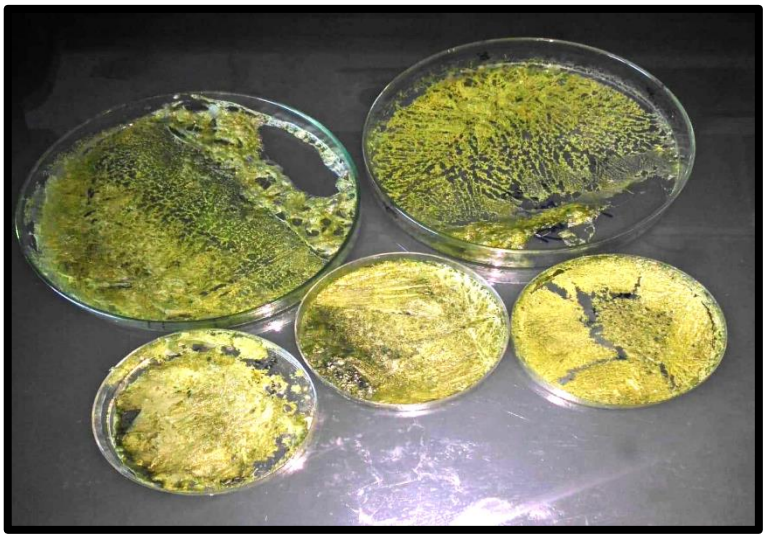
Şekil 2.3: (a)Ultrafiltrasyon işleminin gerçekleştirildiği sistem (b) Sisteme numunenin yüklenmesi (c) Ultrafiltrasyon işleminin gerçekleştirilmesi

2.2.3 Biyoaktif peptitlerin kurutulması – Liyofilizasyon metodu

Ultrafiltrasyon işlemi ile ön saflaştırma işleminden geçen biyoaktif peptitler dondurarak kurutucu ile -55°C'de 18 saat boyunca kurutulmuştur (Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Almanya). Kurutulmuş numuneler, ileri analizler için hava almayacak şekilde paketlenerek -18°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.4: Dondurarak kurutma işlemi yapılan liyofilizatör cihazı.



Şekil 2.5: Kurutulmuş örnekler.

2.2.4 Biyoaktif peptitlerin saflaştırılması

Ultrafiltrasyondan elde edilen, dondurarak kurutulmuş ve <3 kDa molekül ağırlığındaki biyoaktif peptit fraksiyonunun daha ileri aşamada saflaştırılması amacıyla jel geçirgenlik kromatografisi uygulanmıştır. Çapı 3 cm olan mini kolona manuel olarak Sephadex G-25 (Sigma Aldrich) dolgu maddesi konulmuş, distile su ile dengelenmiş ve kolon akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde ayarlanarak numune kolondan geçirilmiştir (Zeng ve diğ., 2008). Elde edilen fraksiyonlar yine dondurarak kurutularak bir sonraki aşamada kullanılmak için muhafaza edilmiştir.

2.2.5 Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu

Biyoaktif peptitler sahip oldukları fonksiyonel özelliklere karşın; kimyasal olarak stabil olmayan ve *in vivo* yarı ömrü kısa olan bileşenlerdir. Saflaştırılmış biyoaktif peptitlerin fonksiyonel özelliklerini en iyi düzeyde gösterebilmeleri, biyoyararlılıklarını koruyabilmeleri ve farklı ortam koşullarındaki stabilitelerinin iyileştirilebilmesi için enkapsülasyon işleminden yararlanılabileceği bildirilmektedir. Bu nedenle tez çalışmaları kapsamında elde edilen biyoaktif peptitlere enkapsülasyon işlemi uygulanmıştır. Oluşturulan Box-Behnken deney tasarımına göre farklı formülasyonlarda kapsüller hazırlanmıştır. Aljinat konsantrasyonu, kalsiyum klorür konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonunun enkapsülasyon verimi ve elde edilen enkapsüle formdaki biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu iyonik jelasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı malzeme olarak ısıl stabilitesi yüksek olan ve yine alglerden elde edilen bir malzeme olan aljinat seçilmiştir. Enkapsülasyon işlemi için en uygun formülasyonu belirlemek amacıyla tepki yüzey metodolojisi kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışılan bağımsız faktörler olan aljinat konsantrasyonu (%1,4-1,6), kalsiyum klorür konsantrasyonu (%2-5) ve biyoaktif peptit konsantrasyonunun (%1-5) enkapsülasyon verimi ve elde edilen enkapsüle formdaki biyoaktif peptitlerin antioksidan özelliklerine etkileri incelenmiştir. Deney tasarımında kullanılan değişkenler ve bu değişkenlerin seviye değerleri belirlenirken literatürdeki benzer çalışmalar (Cerciello ve diğ., 2017; Lee ve diğ., 2019) ve tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen ön denemelerin sonuçları esas alınmıştır. Box-Behnken tasarımı

kullanılarak oluşturulan ve toplam 15 deneyden oluşan tasarım Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonu için oluşturulan deney tasarımı.

Deney No	Aljinat oranı (%)	$CaCl_2$ oranı (%)	Biyoaktif peptit oranı (%)
1	1,4	3,5	1
2	1,6	5,0	3
3	1,6	2,0	3
4	1,4	3,5	5
5	1,5	2,0	5
6	1,5	3,5	3
7	1,6	3,5	5
8	1,5	3,5	3
9	1,4	5,0	3
10	1,5	5,0	5
11	1,5	5,0	1
12	1,6	3,5	1
13	1,5	3,5	3
14	1,4	2,0	3
15	1,5	2,0	1

İyonik jelasyon ile enkapsülasyon işleminde Çizelge 2.1'de belirtilen oranlarda biyoaktif peptit ve aljinat, distile suda çözdürülmüş; ardından belirli konsantrasyonda $CaCl_2$ çözeltisine eklenmiş ve elde edilen enkapsüle ürün kurutulmuştur. Deney tasarımına göre elde edilen enkapsüle formdaki ürünün toplam azot miktarı, enkapsülasyon verimi ve antioksidan özellikleri (toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite) belirlenmiştir. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve ortalama ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir.

Enkapsülasyon verimini belirlemek için elde edilen kapsüller çözünmeleri için sodyum sitrat tamponunda (0,2g numune/ml tampon çözeltisi) bekletilip vortekslendikten sonra analiz edilmiştir. Toplam azot miktarı 2.2.8 no'lu bölümde belirtilen şekilde Kjeldahl metodu ile tayin edilmiştir. Enkapsülasyon verimi aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır:

$$V\ (\%) = w_1/w_2 \times 100 \qquad (2.1)$$

Denklem 2.1'de görüldüğü üzere enkapsülasyon verimi (V), enkapsüle edilmiş partikül içindeki gerçek polipeptit miktarı (w_1)'nın başlangıç giriş polipeptit miktarı (w_2)'na bölümünün 100 ile çarpılması ile bulunur.

$$P(\%) = w_1/w_3 \times 100 \qquad (2.2)$$

Polipeptit içeriği(P) de denklem 2.2'de görüldüğü gibi enkapsüle edilmiş partikül içindeki gerçek polipeptit miktarı (w_1)'nın partikülün ağırlığı (w_3)'na bölümünün 100 ile çarpılması ile bulunur.

Antioksidan özellikler ise 2.2.7 no'lu bölümlerde belirtilen şekilde belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde aşağıda verilen polinom eşitliğinden yararlanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^{k} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \qquad (2.3)$$

Bu denklemde Y tepki, β_0 ortalama etki, β_i, β_{ii}, β_{iii} ise sırasıyla değişkenlerin lineer, kuadratik ve etkileşimleri için belirlenen regresyon katsayılarıdır. X_i ve X_j de bağımsız değişkenlerdir. Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları elde edilmiştir. Seçilen bu modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) sonuçları ile değerlendirilmiştir. Enkapsülasyon verimi ve antioksidan özellikler açısından en iyi sonuçları veren koşullar yazılımın optimizasyon fonksiyonu ile belirlenerek bu koşullarda enkapsülasyon işlemi tekrar edilmiş ve modelin validasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 *İn vitro* gastrointestinal sindirim modeli ile biyoyararlılık analizleri

İn vitro gastrointestinal sindirim modeline göre gerçekleştirilen biyoyararlılık analizleri için öncelikle ağız, mide ve bağırsak sıvıları ve α-amilaz, pepsin, safra ve pankreatin enzimleri hazırlanmıştır. Ağız, mide ve bağırsak sıvıları için ortak kullanılacak olan;

- 0,5 M Potasyum klorür (KCl)
- 0,5 M Mono potasyum fosfat ($KH_2\ PO_4$)
- 1 M Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)
- 2 M Sodyum klorür (NaCl)
- 0,15 M Magnezyum klorür hekzahidrat ($(MgCl)_2.6H_2O$)
- 0,5 M Amonyum karbonat ($(NH_4)_2CO_3$)
- 6 M Hidroklorik asit (HCl)
- 0,3 M Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$)

çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler aşağıdaki Çizelge 2.2'ye göre birleştirilerek ağız, mide ve bağırsak sıvıları hazırlanmıştır (Minekus ve diğ., 2014).

Çizelge 2.2: Biyoyararlılık analizinde kullanılan kimyasallar.

	KCl	KH_2PO_4	$NaHCO_3$	NaCl	$(MgCl)_2.6H_2O$	$(NH_4)_2CO_3$	HCl
Ağız sıvısı	15,1 ml	3,7 ml	6,8 ml	-	0,5 ml	0,06 ml	0,09 ml
Mide sıvısı	6,9 ml	0,9 ml	12,5 ml	11,8 ml	0,4 ml	0,5 ml	1,3 ml
Bağırsak sıvısı	6,8 ml	0,8 ml	42,5 ml	9,6 ml	1,1 ml	-	0,7 ml

Hazırlanan çözeltiler 400ml'ye distile su ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Enzimler ise aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

α-amilaz: 15 mg α-amilaz tartılmış, 10 mL ağız sıvısı eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Pepsin: 100 mg pepsin tartılmış, 10 mL mide sıvısı eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Pankreatin: 80 mg pankreatin tartılmış, 10 mL bağırsak sıvısı eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Safra: 250 mg safra tartılmış, 10 mL bağırsak sıvısı eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

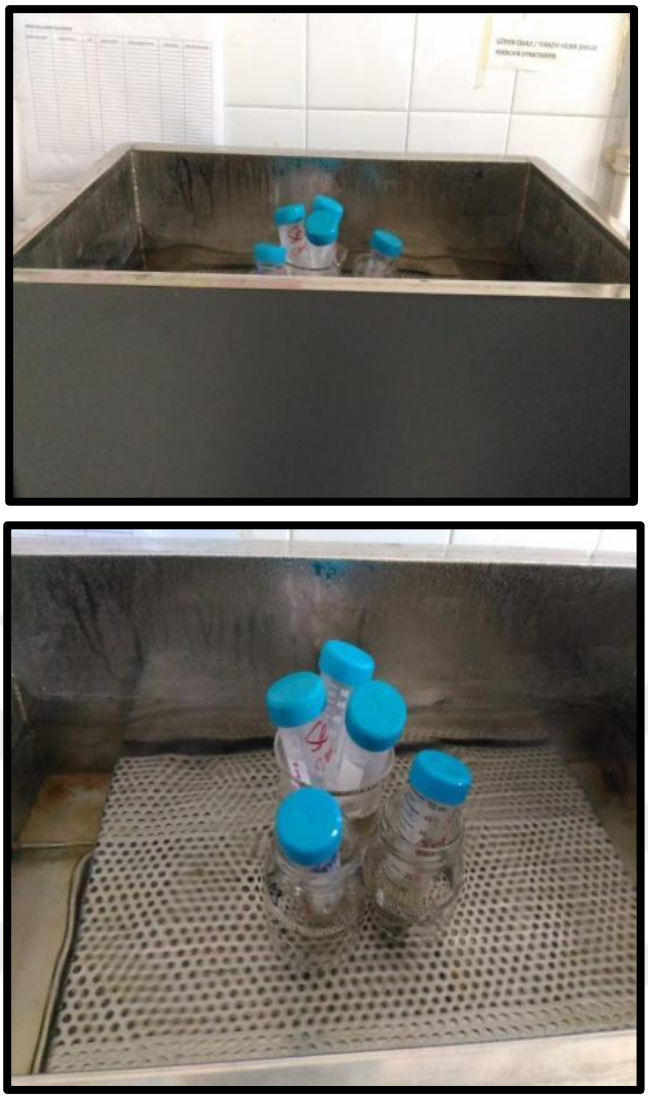
Ağız basamağı için tüpe konulan 0,2 gr örneğin üzerine 3,5 mL ağız sıvısı, 0,5 mL α-amilaz ve 25 µL $CaCl_2.2H_2O$ ve 975 µL distile su eklenmiştir. Karışımın pH değeri $CaCl_2.2H_2O$ çözeltisi (0.3 M) ile pH 7.0'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan numune 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 dakika süreyle inkübe edilmiş; ve

işlem tamamlandığında sonraki analizler için 2 mL numune ayrılarak kalan numune ile mide aşamasına devam edilmiştir.

Mide aşamasında numunenin üzerine 6 mL mide sıvısı, 1,28 mL pepsin, 4 µL $CaCl_2.2H_2O$, 0,16 mL HCl ve 0,556 µL distile su eklenmiştir. Karışımın pH'ı, midenin pH değeri olan pH 3.0'e, toplam hacim sabit kalmak üzere HCl ile ayarlanmıştır. Mide basamağının tamamlanması için 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İki saatin sonunda 2 mL numune ileriki analizler için ayrılarak bağırsak basamağına devam edilmiştir.

Bağırsak basamağında örneklerin üzerine 7,7 mL bağırsak sıvısı, 3,5 mL pankreatin, 1,75 mL safra, 28 µL $CaCl_2.2H_2O$, 0,105 mL NaOH ve 0,917 µL distile su eklenmiştir. Karışımın pH değeri NaOH (1M) ile pH 7.0 olacak şekilde ayarlanmış ve örnekler 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İki saatin sonunda örnekler ileriki analizler için saklanmıştır.

Ağız, mide ve bağırsak aşamalarının her birinden alınan örneklere toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite (CUPRAC, DPPH ve ABTS metodları) analizleri yapılmıştır.



Şekil 2.6: Biyoyararlılık analizinin uygulanması

2.2.7 Spektrofotometrik analizler

Ham haldeki *Spirulina platensis*, ham haldeki selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*, *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit, selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit, enkapsüle edilmiş biyoaktif peptit ve selenyumca zenginleştirilmiş *Spirulina platensis*'den elde edilmiş biyoaktif peptit numunelerine toplam fenolik madde analizi ve toplan antioksidan kapasite analizleri uygulanmıştır.

2.2.7.1 Toplam fenolik madde analizi

100 µL seyreltilmiş örnek üzerine, 0.75 mL 1:10 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteau reaktifi (2N) ve 0,75 mL %6'lık sodyum karbonat çözeltisi eklenmiş ve vorteks ile karıştırılarak 90 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta

bekletilmiştir. Süre dolduğunda örneklerin absorbansı spektrofotometrede 760 nm'de köre karşı okunmuş ve sonuçlar "mg gallik asit ekivalent (GAE)/100 g numune" olarak hesaplanmıştır (Spanos & Wrolstad, 1990).

2.2.7.2 Toplam antioksidan kapasite analizi

DPPH metodu

100 µL örnek üzerine 2 mL 0.1 mM DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) çözeltisi konularak vortekslenmiş ve 30 dakika süre ile oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 517 nm'de metanole karşı okunmuştur. Sonuçlar "mg Trolox ekivalent (TE)/100 g numune" olarak hesaplanmıştır (Kumaran & Joel Karunakaran, 2006).

CUPRAC metodu

100 µL örnek üzerine 1 mL 0.01 M bakır (II) klorür ($CuCl_{2..}2H_2O$), 1 mL amonyum asetat (NH_4Ac) tampon çözeltisi (pH 7.0), 1 mL 0.0075 M neokuproin ve 1 mL distile su eklenerek, vorteksle karıştırılmış ve 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 450 nm absorbans değerinde köre karşı okuma yapılmıştır. Sonuçlar, "mg Trolox ekivalent (TE)/ 100 g numune''olarak verilmiştir (Apak ve diğ., 2006).

ABTS metodu

ABTS stok çözeltisi için, ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) diammonyum tuzu) (1.1 g/L distile su) $K_2S_2O_8$ (potasyum persülfat) (19 g/L distile su) çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak karıştırılmış ve radikalizasyonun tamamlanması için, bir gece boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Stok ABTS çözeltisi 734 nm'de absorbans değeri 0.9 ± 0.2 olana dek potasyum fosfat tampon çözeltisi (0.05 M) (pH=8) ile seyreltilmiştir.

Absorbans değeri ayarlanmış ABTS çözeltisinden 1 mL alınarak üzerine 100 µL örnek eklenmiş ve 10 saniye süre ile vortekslenmiştir. Yaklaşık 1 dk sonra spektrofotometrede absorbans değerleri 734 nm'de köre karşı okunmuş ve sonuçlar "mg Trolox ekivalent (TE)/100 g numune" olarak hesaplanmıştır (Miller & Rice-Evans, 1997).

2.2.8 Protein analizi

Toplam ham protein tayini Kjeldahl metoduna (AOAC 981.10, 1998) göre Kjeldahl azot protein tayin cihazı kullanılarak yapılmıştır.

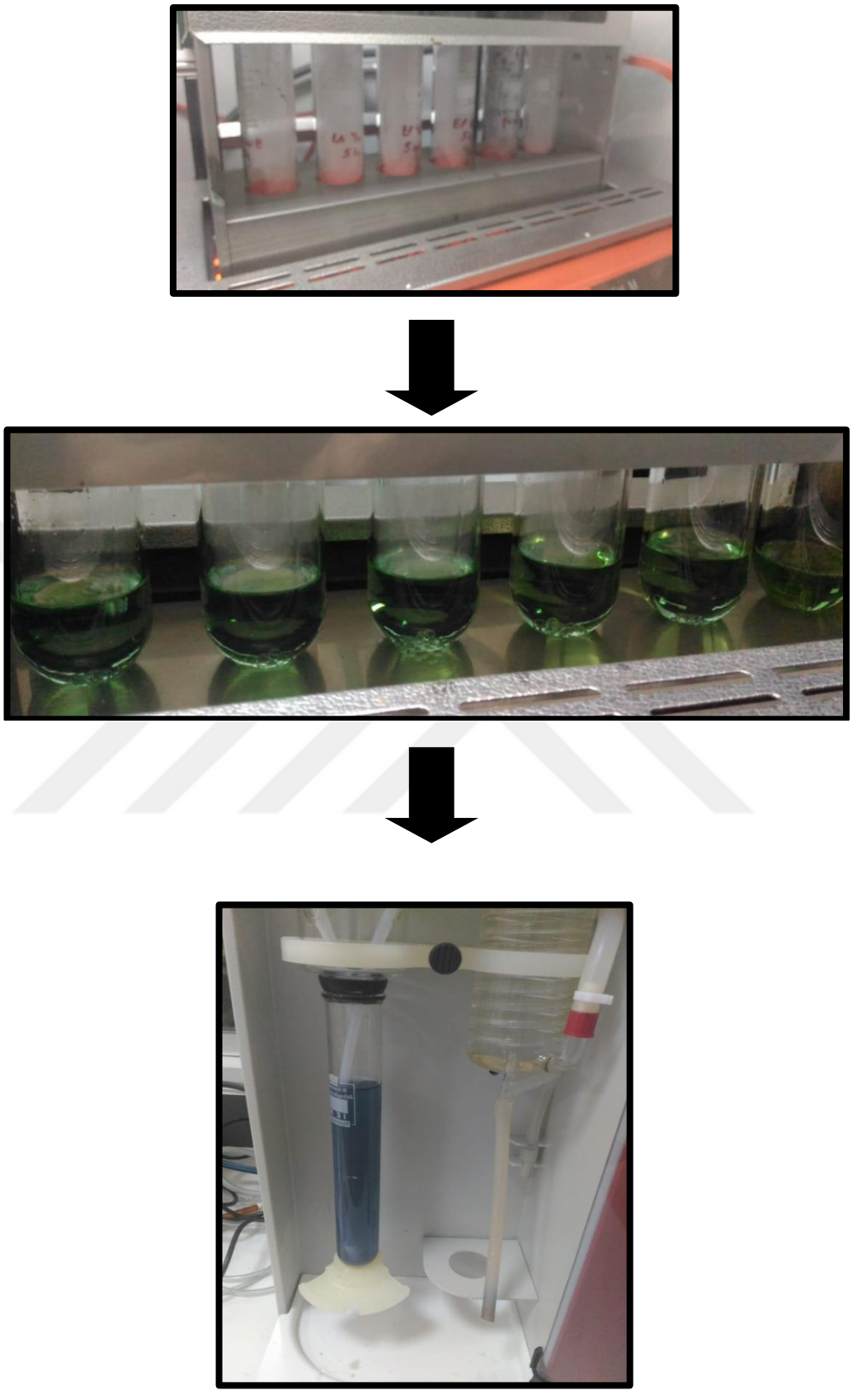
Her bir örnekten 0.2 g tartılarak Kjeldahl tüpüne konulmuş ve üzerine 12 g potasyum sülfat, 0,3 g bakır sülfat ve 25 mL sülfürik asit eklenmiştir. Tüpler Kjeldahl ünitesine yerleştirilerek yakma işlemine başlanmıştır. Yakma işleminin tamamlanmasının ardından soğuyan tüpler sırası ile 50 mL distile su eklenerek distilasyon işlemi için distilasyon ünitesine konulmuştur. Distilasyon ünitesinin damıtma kısmına erlene üzerine indikatör eklenmiş 25 mL borik asit eklenerek yerleştirilmiştir. Distilasyon işlemi sonucu erlendeki çözelti HCl ile titre edilerek sonuçlar not edilmiştir. Not edilen miktarlara göre aşağıdaki eşitlikler yardımı ile hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

Örnekler aşağıdaki denklemlerle hesaplanmıştır;

$$\%\mathrm{N} = \frac{14.01 \times (\mathrm{A} - \mathrm{B}) \times \mathrm{M} \times 100}{\mathrm{g} \times 10} \tag{2.4}$$

$$\%\mathrm{Protein} = \%\mathrm{N} \times 6.25 \tag{2.5}$$

Yüzde azot ve yüzde protein miktarlarının hesaplanması için gerekli olan veriler; örnek için sarf edilen HCl miktarı A, kör için sarf edilen HCl miktarı B, örnek miktarı g olmak üzere Denklem 2.4 ve 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.7: Kjeldahl azot tayininin uygulanması

3 SONUÇ VE ÖNERİLER

3.1 Sonuçlar

3.1.1 Hidrolizat analizleri

Temin edilen *Spirulina platensis* gruplarının protein ve nem içeriklerine bakılmış ve sonuçlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Selenyum ilavesiz ve farklı oranlarda selenyum ilaveli *Spirulina platensis* örneklerinin protein içerikleri.

Örnek Çeşidi	%Protein	%Nem
Sp201	74,66±2,31[a]	7,36±0,28[c]
Sp202	74,24±1,92[a]	8,43±0,17[b]
Sp30	75,98±0,92[a]	9,41±0,18[a]
SpKontrol	67,73±0,13[b]	8,17±0,18[b]

Sp201: 20mg/L Selenyum kullanılarak 1.havuzda üretilen numuneler; Sp202: 20mg/L Selenyum kullanılarak 2.havuzda üretilen numuneler; Sp30: 30mg/L Selenyum kullanılarak üretilen numuneler; SpKontrol: Selenyumsuz *Spirulina platensis* örnekleri
Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtilmiş olup, aynı sütunda farklı harfle belirtilen örnekler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$) (n=3).

Bu sonuçlara göre selenyum ilaveli *Spirulina platensis* örneklerinin ortalama protein içeriğinin %74,96±0,91 oranında olduğu ve Selenyum ilavesiz kontrol örneklerinden istatistiki olarak daha yüksek olduğu izlenmiştir ($p<0,05$). Nem içeriği bakımından ise; örnekler %8,17 ila 9,41 arasında değişen değerler almıştır.

Spirulina platensis'ten yüksek oranda BAPelde edebilmek için en uygun yöntemin belirlenmesi/ modifiye edilmesi amacıyla literatür araştırmaları yapılmış ve uygun bulunan 2 yöntem Çizelge 3.2'deki gibi karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.2: Farklı metotla *Spirulina plantensis*'in hidrolizatlarından elde edilen protein oranları.

Yu ve diğ. (2016)	%Protein	Wang ve Zang (2016)	%Protein
A1	39,50±0,17	**A1**	10,36±0,14
A5	54,86±0,15	**A5**	35,90±0,73
F5	45,99±0,23	**F5**	11,77±0,43
F8	32,93±1,77	**F8**	43,49±0,50

*A1: Alkalaz ile 1 saatlik enzim aktivasyonu; A5: Alkalaz ile 5 saatlik enzim aktivasyonu; F5: Flavourzyme ile 5 saatlik enzim aktivasyonu; F8: Flavourzyme ile 8 saatlik enzim aktivasyonu. Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde belirtilmiştir (n=2).

Bu sonuçlara dayanarak Yu ve diğ. (2016) tarafından uygulanan metotta Alkalaz ve Flavourzyme için elde edilen değerler, (Wang & Zhang, 2017) metodu ile elde edilen değerlere göre kullanım için daha uygun bulunmuştur. Yu ve diğ. (2016) tarafından uygulanan yöntemle enzimin direkt etkisi gözlenebilmiş ve *Spirulina* hücreleri diğer yöntemde olduğu gibi fiziksel ve mekanik kuvvetler ile ekstrakte edilmemiştir. Böylece *Spirulina* hücrelerinden, protein gibi hücre içi komponentler açısından daha yüksek kazanım elde edildiği düşünülmektedir (Verdasco-Martín ve diğ., 2019). Ayrıca alkalaz enzimi daha az maliyetli ve literatürde *Spirulina platensis* için daha fazla kullanılmıştır.

Çizelge 3.3'te ise; SpKontrol örneklerine Alkalaz enzimi farklı hidroliz sürelerinde uygulanarak, elde edilen peptitlerin oranı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca; dondurarak kurutma sonrasında elde edilen peptitlerin nem içerikleri de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak, A5 ve A8'in %56,88±0,60 protein oranı ile birbirine benzer ve A1 ve A4'ten (%49,95±0,15) istatistiki olarak daha yüksek oranda protein içerdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Maliyet ve zaman açısından değerlendirildiğinde, peptit eldesinde alkalaz ile 5 saat hidroliz işleminin kullanılmasına karar verilmiştir (Y. Ma ve diğ., 2016; Verdasco-Martín ve diğ., 2019).

Çizelge 3.3: Alkalaz enzimi ile SpKonrol örneklerinin hidrolizi sonrası protein ve nem oranları.

*Hidroliz süresi	%Protein	%Nem
A1	50,05±1,36^{b}	6,11±0,15^{c}
A4	49,84±0,34^{b}	6,31±0,05^{bc}
A5	56,45±0,66^{a}	6,50±0,06^{b}
A8	57,30±1,36^{a}	7,46±0,20^{a}

*A1: Alkalaz ile 1 saat hidroliz; A4: Alkalaz ile 4 saat hidroliz; A5: Alkalaz ile 5 saat hidroliz; A8: Alkalaz ile 8 saat hidroliz. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtilmiş olup, aynı sütunda farklı harfle belirtilen örnekler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$) (n=3).

Ayrıca literatürde alkalaz ile en yüksek biyoaktif peptit elde edilebileceği (Lu ve diğ., 2010) ve alkalaz hidrolizatları diğer enzimlerle oluşturulan hidrolizatlara göre daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak; dondurarak kurutma sonrasında elde edilen peptitlerin nem içerikleri de %6,11-7,46 olarak belirlenmiştir.

Çukurova Üniversitesi tarafından üretilen ham haldeki toz *S. platensis* ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* ile bunlardan eldeedilen saflaştırılmış biyoaktif peptitlerin toplam fenolik madde miktarları ve toplam antioksidan kapasiteleri (DPPH, CUPRAC ve ABTS olmak üzere 3 farklı yöntem kullanılarak) analizlenmiştir. Buna ek olarak, örneklerin biyoyararlılıkları *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.1.2 Antioksidan analizleri

3.1.2.1 Toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite sonuçları

Örneklerin antioksidan özelliklerini belirlemek için toplam fenolik madde (TFM), toplam antioksidan kapasite (TAK) (CUPRAC, DPPH ve ABTS olmak üzere 3 ayrı metot ile) tayinleri yapılmıştır. Ham *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numunelerinin ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitlerin (SpBAP ve SeBAP) antioksidan özelliklerinin sonuçları Çizelge 3.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4: Ham (normal koşullarda elde edilmiş) *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numunelerinin ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitlerin (SpBAP ve SeBAP) antioksidan özellikleri*.

Örnek	TFM (mg GAE/100 g numune)	TAK (mg TE/100 g numune)		
		CUPRAC	DPPH	ABTS
Sp	185,4 ± 5,3[d]	864,5 ± 27,3[d]	234,8 ± 22,5[b]	193,4 ± 14,7[b]
Se	225,3 ± 10,0[c]	1168,9 ± 61,4[c]	273,5 ± 22,7[b]	201,3 ± 10,9[b]
SpBAP	824,6 ± 17,2[a]	3114,2 ± 80,0[a]	513,5 ± 31,9[a]	343,6 ± 5,8[a]
SeBAP	566,0 ± 30,1[b]	2576,3 ± 172,8[b]	559,1 ± 46,9[a]	336,5 ± 6,2[a]

[1,2]Sonuçlar en az altı ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05). TFM: Toplam fenolik madde içeriği, TAK: Toplam antioksidan kapasite, CUPRAC: Bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi, DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal yakalama kapasitesi, ABTS: 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik acsit) diammonyum tuzu) radikal yakalama kapasitesi. Sp: Ham *S. platensis*, Se: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis*, SpBAP: Ham *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit, SeBAP: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis*ten elde edilen biyoaktif peptit.

Örneklerin TFM içeriği ve TAK analiz sonuçları Çizelge 3.4'te incelendiğinde; TFM bakımından en yüksek değeri 824,6 mg GAE/100 g numune ile SpBAP göstermektedir (p<0,05). Bunu, sırasıyla, SeBap (566,0 mg GAE/100 g numune), Se (225,3 mg GAE/100 g numune) ve Sp (185,4 mg GAE/100 g numune) takip etmektedir. Örneklerdeki toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biri olan CUPRAC metodu ile elde edilen sonuçlara göre örneklerin sıralaması, TFM tayini ile elde edilen sıralamayla paralel olarak, SpBAP>SeBAP>Se>Sp şeklinde belirlenmiştir (p<0,05). DPPH metodu ile elde edilen TAK değerleri SpBAP ve SeBAP örnekleri için istatistiksel olarak farklı bulunmamış ve benzer değerlerde olan olan Sp ve Se örneklerinden istatistiksel olarak daha yüksek ölçülmüştür (p<0,05). ABTS metodu ile tespit edilen TAK değerleri 193,4 ila 343,6 mg TE/100 g arasında değişen değerler almıştır. SpBAP ve SeBAP örnekleri için ABTS metodu ile belirlenen TAK değerleri Sp ve Se örnekleri için belirlenen değerlerden istatistiksel olarak daha yüksek ölçülmüştür (p<0,05) (Çizelge 3.4).

Ultrafiltrasyon işlemi ile saflaştırılan ve 3 kDa'dan daha küçük tanecik boyutundaki BAP örnekleri ham numuneyle karşılaştırıldığında (Çizelge 3.4), toplam fenolik

madde içeriği ve toplam antioksidan kapasitesi değerlerinin istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Benzer literatür çalışmalarında da protein hidrolizatlarının, ham proteinlere oranla daha yüksek antioksidan değerler aldığı rapor edilmiştir (Ji ve diğ., 2014; Luo ve diğ., 2020). Bu çalışmada, *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptitler için belirlenen antioksidan kapasite değerleri, literatürde yumurta beyazı (Liu ve diğ., 2015), balık (You ve diğ., 2010), fermente keçi sütü (Panchal ve diğ., 2020) ve yulaf globulininden (S. Ma ve diğ., 2020) elde edilen <3 kDa boyutundaki biyoaktif peptitler için elde edilen değerlerden daha yüksektir.

3.1.2.2 *İn vitro* biyoyararlılık analizinden elde edilen örneklerde toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite sonuçları

Ham *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numunelerine ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitlere (SpBAP ve SeBAP) *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modeli ile biyoyararlılık analizleri uygulanmış ve analiz sırasında ağız, mide ve bağırsak basamaklarından toplanan örneklere toplam fenolik madde içeriği (TFM), toplam antioksidan kapasitesi (TAK) (CUPRAC, DPPH, ABTS olmak üzere 3 farklı metod uygulanmıştır) tayinleri uygulanmıştır. Toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasitesi analizlerinin sonuçları Çizelge 3.5 'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TFM içeriği.

Örnek	**TFM** [1,2] (mg GAE/100 g numune)			
	Sindirim öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
Sp	$185,4 \pm 5,3^{d}$	$37,0 \pm 1,1^{c}$(%20)	$7,6 \pm 2,2^{c}$(%4)	$9,2 \pm 2,2^{c}$(%5)
Se	$225,3 \pm 10,0^{c}$	$47,1 \pm 2,5^{b}$(%21)	$5,6 \pm 2,4^{c}$(%2)	$17,6 \pm 2,3^{a}$(%8)
SpBAP	$824,6 \pm 17,2^{a}$	$49,5 \pm 1,4^{b}$(%6)	$23,3 \pm 1,0^{b}$(%3)	$10,2 \pm 0,8^{c}$(%1)
SeBAP	$566,0 \pm 30,1^{b}$	$71,0 \pm 5,4^{a}$(%13)	$32,3 \pm 2,6^{a}$ (%6)	$14,9 \pm 1,3^{b}$ (%3)

[1]Sonuçlar en az altı ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır ($p<0,05$). TFM: Toplam fenolik madde içeriği. Sp: *S. platensis*, Se: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis,* SpBAP:Ham *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit, SeBAP: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit.

[2]Parantez içerisinde gösterilen rakamlar, her bir sindirim basamağı sonrasında -sindirim öncesinde belirlenen TFM içeriğinden- geri kazanılan TFM içeriğini yüzde olarak ifade etmektedir.

Başlangıç örneklerindeki ve *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modelinde uygulanan ağız, mide ve bağırsak basamaklarından toplanan örneklerdeki TFM içerikleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, her bir basamak için elde edilen sıralama, sırasıyla, başlangıç örnekleri için, SpBAP>SeBAP>Se>Sp; ağızdaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için, SeBAP>SpBAP>Se>Sp; midedeki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SeBAP>SpBAP>Sp>Se ve bağırsaktaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için Se>SeBAP>SpBAP>Sp şeklindedir (Çizelge 3.5). Başlangıç örneklerindeki TFM içeriklerinin ne kadarının ağız, mide ve bağırsak basamaklarındaki sindirim sonrasında geri kazanıldığına bakıldığında; ağızdaki sindirim sonrasında en yüksek geri kazanımın %21 oranı ile Se örneğinde olduğu ölçülmüş ve bu örneği sırasıyla, Sp (%20), SeBAP (%13) ve SpBAP (%6) örnekleri takip etmiştir. Midedeki sindirim sonrasında elde edilen en yüksek TFM geri kazanımı SeBAP (%6) için belirlenmiş; bu örneği, sırasıyla, Sp (%4), SpBAP (%3) ile Se (%2) örnekleri takip etmiştir. Bağırsak sindiriminden sonraki en yüksek TFM içeriği geri kazanımı ise Se (%8) örneği için ölçülmüş ve bunu, sırasıyla, Sp (%5), SeBAP (%3) ve SpBAP (%1) örnekleri takip etmiştir (Çizelge 3.5). Buna göre, *in vitro* biyoyararlılık analizinin en son basamağı olan bağırsak sindiriminden sonra başlangıç örneklerinin TFM içeriklerindeki toplam kayıp Sp örneği için %95, Se örneği için %92, SpBAP örneği için %99, SeBAP örneği için ise %97 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda, *in vitro* sindirim işlemi sırasında, biyoaktif peptitlerin TFM içeriğindeki kayıpların ham örneklerin TFM içeriğindeki kayıplardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.6: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TAK değerleri (CUPRAC (bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi) metodu).

Örnek	**TAK (CUPRAC metodu)[1,2]** (mg TE/100 g numune)			
	Sindirim öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
Sp	$864,5 \pm 27,3^{d}$	$81,0 \pm 2,2^{c}$(%9)	$17,3 \pm 4,2^{c}$(%2)	$13,2 \pm 2,5^{c}$(%2)
Se	$1168,9 \pm 61,4^{c}$	$110,9 \pm 9,3^{b}$(%9)	$14,5 \pm 0,5^{c}$(%1)	$17,3 \pm 4,3^{b}$(%1)
SpBAP	$3114,2 \pm 80,0^{a}$	$141,2 \pm 8,8^{a}$(%5)	$61,2 \pm 9,3^{a}$(%2)	$21,2 \pm 2,0^{a}$(%1)
SeBAP	$2576,3 \pm 172,8^{b}$	$87,5 \pm 10,8^{c}$(%3)	$36,9 \pm 5,7^{b}$(%1)	$13,2 \pm 1,9^{c}$(%1)

Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05). CUPRAC: Bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi. Sp: Ham *S. platensis*, Se: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis*, SpBAP: Ham *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit, SeBAP: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis'*ten elde edilen biyoaktif peptit.

[2]Parantez içerisinde gösterilen rakamlar, her bir sindirim basamağı sonrasında -sindirim öncesinde belirlenen TFM içeriğinden- geri kazanılan TFM içeriğini yüzde olarak ifade etmektedir.

Başlangıç örneklerindeki ve *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modelinde uygulanan ağız, mide ve bağırsak basamaklarından toplanan örneklerdeki CUPRAC değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, her bir basamak için elde edilen sıralama, sırasıyla, başlangıç örnekleri için, SpBAP>SeBAP>Se>Sp; ağızdaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için, SpBAP>Se>SeBAP>Sp; midedeki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SpBAP>SeBAP>Sp>Se ve bağırsaktaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SpBAP>Se>SeBAP=Sp şeklindedir (Çizelge 3.6). Başlangıç örneklerindeki CUPRAC değerlerinin ne kadarının ağız, mide ve bağırsak basamaklarındaki sindirim sonrasında geri kazanıldığına bakıldığında; ağızdaki sindirim sonrasında en yüksek geri kazanımın %9 oranı ile Sp ve Se örneklerinde olduğu ölçülmüş ve bu örnekleri sırasıyla, SpBAP (%5), SeBAP (%3) örnekleri takip etmiştir. Midedeki sindirim sonrasında elde edilen en yüksek CUPRAC geri kazanımı %2 oranı ile Sp ve SpBAP örnekleri için belirlenmiş; Se ve SeBAP örneklerinde ise geri kazanım oranı %1 olarak tespit edilmiştir. Bağırsak sindiriminden sonra ise Sp örneği için geri kazanım oranı %2 iken diğer örnekler için geri kazanım oranı %1 olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.6). Buna göre, *in vitro* biyoyararlılık analizinin en son basamağı olan bağırsak sindiriminden sonra başlangıç örneklerinin CUPRAC değerlerindeki toplam kayıp %98-99 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TAK değerleri (DPPH metodu).

Örnek	**TAK (DPPH metodu)**[1,2] (mg TE/100 g numune)			
	Sindirim öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
Sp	$234,8 \pm 22,5^{b}$	$43,1 \pm 3,6^{b}$(%18)	$11,5 \pm 4,1^{b}$(%5)	$6,1 \pm 2,4^{b}$(%3)
Se	$273,5 \pm 22,7^{b}$	$66,4 \pm 1,6^{a}$(%24)	$6,5 \pm 2,0^{c}$(%2)	$4,3 \pm 1,7^{bc}$(%2)
SpBAP	$513,5 \pm 31,9^{a}$	$43,4 \pm 3,3^{b}$(%8)	$4,3 \pm 3,2^{c}$(%1)	$1,3 \pm 0,4^{c}$(%0,3)
SeBAP	$559,1 \pm 46,9^{a}$	$70,1 \pm 3,6^{a}$(%13)	$35,6 \pm 3,9^{a}$(%6)	$14,5 \pm 2,6^{a}$(%3)

[1]Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05). DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal yakalama kapasitesi. Sp: Ham *S. platensis,* Se: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis,* SpBAP: Ham *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit, SeBAP: Selenyumca zenginleştirilmiş *S.platensis'*ten elde edilen biyoaktif peptit.

[2]Parantez içerisinde gösterilen rakamlar, her bir sindirim basamağı sonrasında -sindirim öncesinde belirlenen TFM içeriğinden- geri kazanılan TFM içeriğini yüzde olarak ifade etmektedir.

Başlangıç örneklerindeki ve *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modelinde uygulanan ağız, mide ve bağırsak basamaklarından toplanan örneklerdeki DPPH değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, her bir basamak için elde edilen sıralama, sırasıyla, başlangıç örnekleri için, SeBAP>SpBAP>Se>Sp; ağızdaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için, SeBAP>Se>SpBAP>Sp; midedeki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SeBAP>Sp>Se>SpBAP ve bağırsaktaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SeBAP>Sp>Se>SpBAP şeklindedir (Çizelge 3.7). Başlangıç örneklerindeki DPPH değerlerinin ne kadarının ağız, mide ve bağırsak basamaklarındaki sindirim sonrasında geri kazanıldığına bakıldığında; ağızdaki sindirim sonrasında en yüksek geri kazanımın %24 oranı ile Se örneğinde olduğu ölçülmüş ve bu örneği sırasıyla, Sp (%18), SeBAP (%13), SpBAP (%8) örnekleri takip etmiştir. Midedeki sindirim sonrasında elde edilen en yüksek DPPH geri kazanımı %6 oranı ile SeBAP örnekği için belirlenmiş; bu örneği sırasıyla, Sp (%5), Se (%2) ve SpBAP (%1) takip etmiştir. Bağırsak sindiriminden sonra ise en yüksek geri kazanım oranı %3 ile Sp ve SeBAP örnekleri için belirlenmiş ve diğer örneklerdeki geri kazanım oranları ise Se için %2 ve Sp BAP için ise %0,3 (Çizelge 3.7). Buna göre, *in vitro* biyoyararlılık analizinin en son basamağı olan bağırsak

sindiriminden sonra başlangıç örneklerinin DPPH değerlerindeki toplam kayıp %97-99 aralığında hesaplanmıştır. Bu çalışmada; Sp, Se, SpBAP ve SeBAP örneklerinin in-vitro ağız, mide ve bağırsakta sindirimleri öncesi ve sonrasındaki DPPH değerleri kıyaslandığında, sindirim sonrasındaki değerlerin ilk duruma göre azaldığı gözlemlenmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8: *S. platensis* (Sp) ve selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se) numuneleri ve bunlardan elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP ve SeBAP) için *in vitro* biyoyararlılık analizi sırasında toplanan örneklerde TAK değerleri (ABTS metodu).

Örnek	**TAK (ABTS metodu)[1,2]** (mg TE/100 g numune)			
	Sindirim öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
Sp	193,4 ± 14,7^{b}	14,5 ± 0,2^{b}(%7)	7,0 ± 0,4^{c}(%4)	7,0 ± 0,5^{b}(%4)
Se	201,3 ± 10,9^{b}	14,6 ± 0,1^{b}(%7)	7,1 ± 0,4^{c}(%4)	5,3 ± 0,7^{c}(%3)
SpBAP	343,6 ± 5,8^{a}	15,4 ± 0,8^{a}(%4)	11,6 ± 1,0^{b}(%3)	9,3 ± 1,2^{a}(%3)
SeBAP	336,5 ± 6,2^{a}	14,9 ± 0,1^{ab}(%4)	13,3 ± 0,8^{a}(%4)	7,1 ± 0,6^{b}(%2)

Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05). ABTS: 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu) radikal yakalama kapasitesi. Sp: Ham *S. platensis*, Se: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis*, SpBAP:Ham *S. platensis'ten* elde edilen biyoaktif peptit, SeBAP: Selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis'*ten elde edilen biyoaktif peptit.

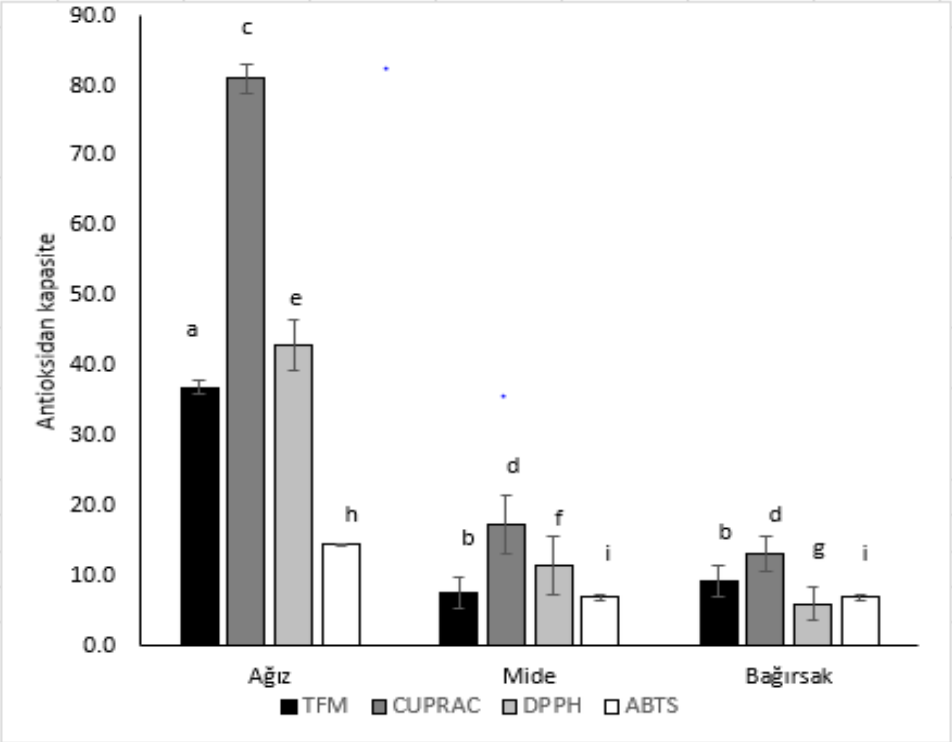
[2]Parantez içerisinde gösterilen rakamlar, her bir sindirim basamağı sonrasında -sindirim öncesinde belirlenen TFM içeriğinden- geri kazanılan TFM içeriğini yüzde olarak ifade etmektedir.

Başlangıç örneklerindeki ve *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modelinde uygulanan ağız, mide ve bağırsak basamaklarından toplanan örneklerdeki ABTS değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, her bir basamak için elde edilen sıralama, sırasıyla, başlangıç örnekleri için, SpBAP>SeBAP>Se>Sp; ağızdaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için, SpBAP>SeBAP>Se>Sp; midedeki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SeBAP>SpBAP>Se>Sp ve bağırsaktaki sindirim sonrasında toplanan örnekler için SpBAP>SeBAP>Sp>Se şeklindedir (Çizelge 2.5). Başlangıç örneklerindeki ABTS değerlerinin ne kadarının ağız, mide ve bağırsak basamaklarındaki sindirim sonrasında geri kazanıldığına bakıldığında; ağızdaki sindirim sonrasında en yüksek geri kazanımın %7 oranı ile Sp ve Se örneklerinde olduğu ölçülmüş ve bu örnekleri %4 geri kazanım oranı ile SpBAP ve SeBAP örnekleri takip etmiştir. Midedeki sindirim sonrasında elde edilen ABTS geri

kazanım oranları %3-4 aralığında hesaplanmıştır. Bağırsak sindiriminden sonra ise en yüksek geri kazanım oranı %4 ile Sp örneği için ölçülmüş; ve Se ve SpBAP örnekleri için %3 geri kazanım oranı belirlenirken ve SeBAP örneği için bu oran %2 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.8). Buna göre, *in vitro* biyoyararlılık analizinin en son basamağı olan bağırsak sindiriminden sonra başlangıç örneklerinin ABTS değerlerindeki toplam kayıp %96-98 aralığında hesaplanmıştır.Bu çalışmada; Sp, Se, SpBAP ve SeBAP örneklerinin tamamı için in-vitro ağız, mide ve bağırsak sindirimi sonrasının sindirim öncesine göre ABTS değerleri azalmıştır (Çizelge 3.8). Gallego ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada da benzer olarak antioksidan peptitin mide ve bağırsakta sindirimi sonrasında ABTS değerinin %90 oranında azalma gösterdiği belirlenmiştir.

TFM ve TAK (CUPRAC, DPPH ve ABTS metodları) analiz sonuçları, bütün örnekler için sindirim sonrası kayıpların %90'ın üzerinde olduğunu göstermektedir.

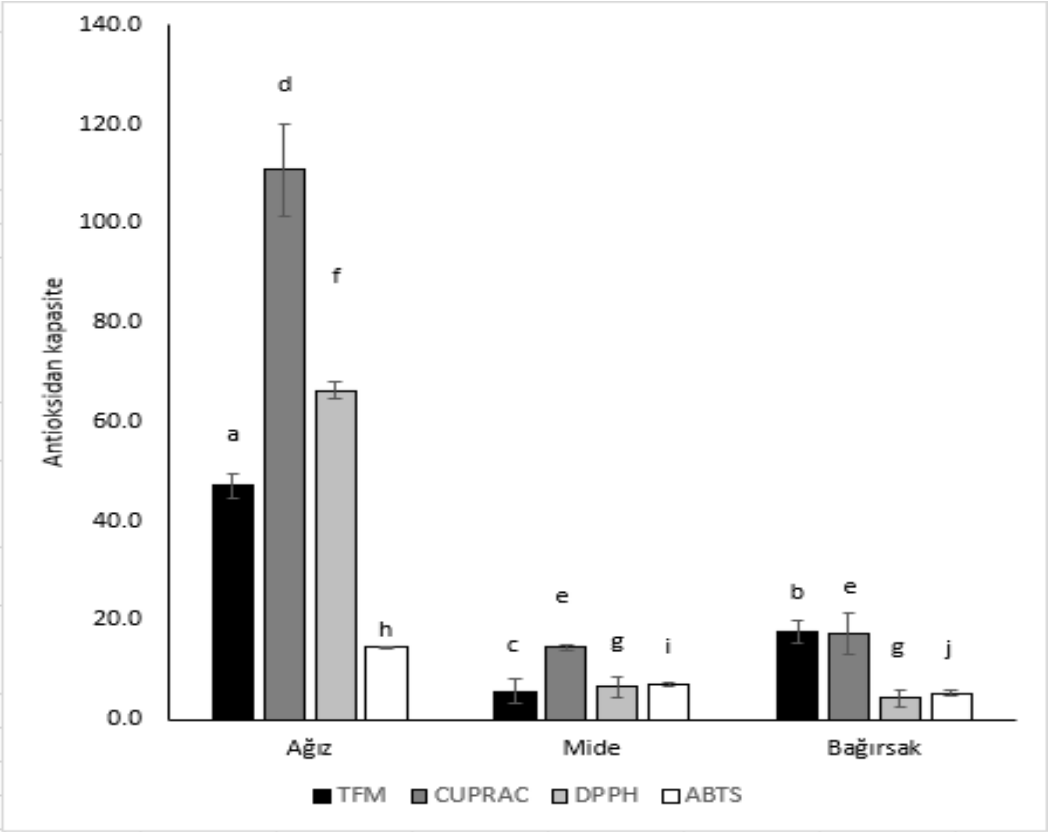
İn-vitro gastrointestinal sindirim sistemi modeli ile sindirime uğratılan ham *S. platensis* (Sp), selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis* (Se), ham *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit (SpBAP) ile selenyumca zenginleştirilmiş *S. platensis'*ten elde edilen biyoaktif peptit (SeBAP) numunelerine yapılan her bir antioksidan kapasitesi analizinin ağız, mide ve bağırsaktaki sindirim aşamalarında olan değişimleri Şekil 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4 'te gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Ham (normal koşullarda elde edilmiş) *S.platensis* numunesinin (Sp) *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı.

*Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Her bir antioksidan kapasite testi içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05).

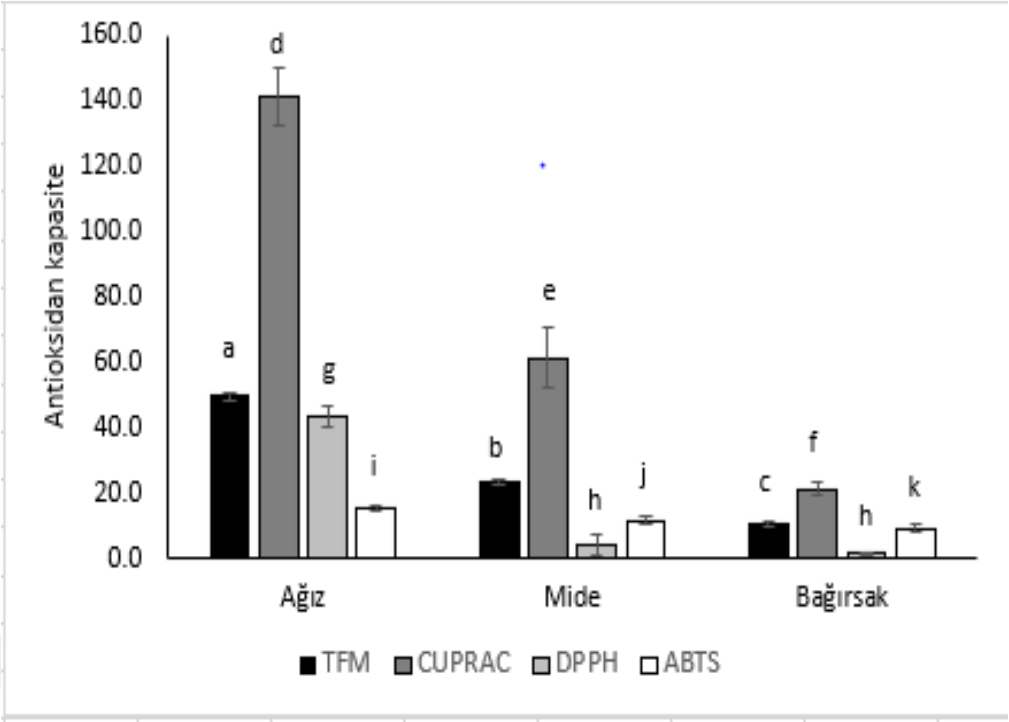
TFM analizi bakımından Sp örnekleri Şekil 3.1'de incelendiğinde; ağızda sindirim sonrası TFM 'nin en yüksek değeri aldığı (37,0 ± 1,1 mg GAE/100 g numune) mide ve bağırsakta sindirim sonrasında ise sonuçların birbirine benzediği ve en küçük değeri karşıladığı gözlenmektedir (8,4 ± 1,1 mg GAE/100 g numune) (p<0,05). Cuprac analizi bakımından; ağızda sindirim sonrasında Cuprac sonuçları en yüksek değeri alırken (81,0 ± 2,2 mg TE /100 g numune) mide ve bağırsakta sindirim sonrasındaki Cuprac sonuçlarının birbirine benzeyerek en küçük değeri verdiği gözlenmektedir (13,9 ± 2,9 mg TE /100 g numune) (p<0,05). DPPH analizleri incelendiğinde ise; en yüksek değerin ağızda sindirim sonrası elde edilen DPPH değerinde bulunduğu (43,1 ± 3,6 mg TE/100 g numune), bunu mide ve bağırsağın takip ettiği görülmüştür (p<0,05). ABTS için sonuçlar incelendiğinde ise; ağızdaki sindirim sonrası elde edilen ABTS değeri (14,5 ± 0,2 mg TE/100 g numune) en yüksek bulunmuş olup, mide ve bağırsaktaki değerler birbirlerine benzeyerek en düşük değeri oluşmaktadırlar (7,0 ±0,0 mg trolox /100 g numune) (p<0,05).



Şekil 3.2: Selenyum ile zenginleştirilmiş *S.platensis* numunesinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı.

*Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Her bir antioksidan kapasite testi içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05).

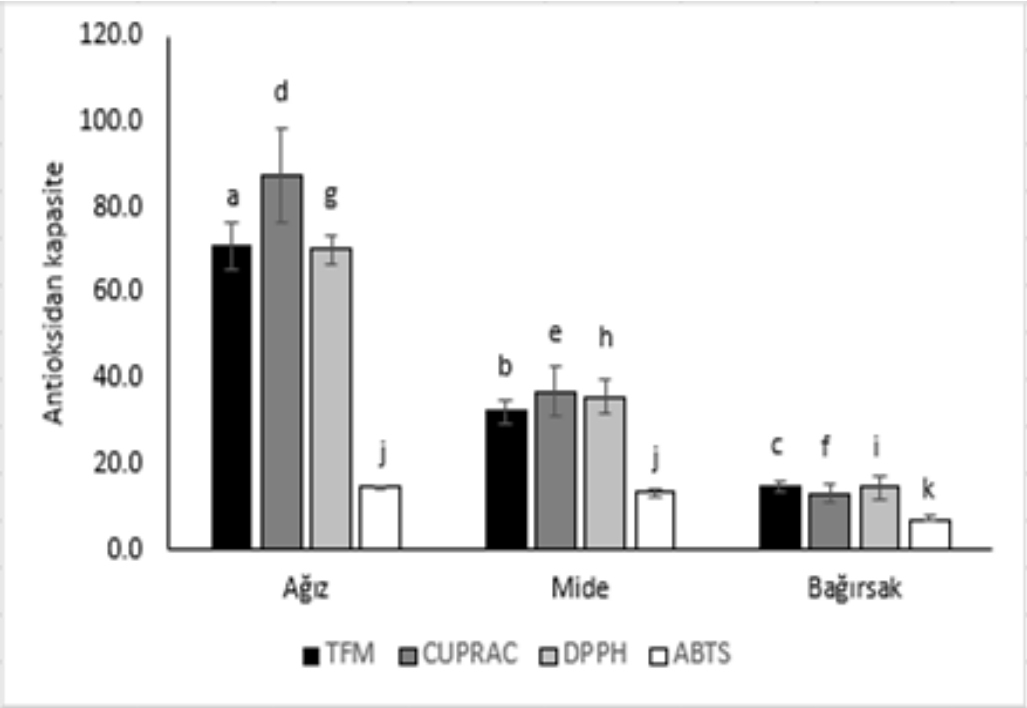
Biyoyararlılık analizi uygulanmış Se örneğinde, TFM analizinin ağız, mide ve bağırsaktaki değişimi Şekil 3.2'de belirtilmiştir. TFM için en yüksekten en düşüğe değerler Şekil 3.2'e göre; ağız> bağırsak> midede sindirim olarak belirtilmiştir. Cuprac analizi sonuçlarında; ağızda sindirim sonucu ölçülen Cuprac değeri en yüksektir (110,9 ± 9,3 mg TE /100 g numune). Mide ve bağırsakta ise Cuprac değerleri birbirine benzer olup en düşük değerdedir (15,3 ± 2,9 mg TE /100 g numune) (p<0,05). DPPH analiz sonuçları incelendiğinde; en yüksek değerin 66,4 ± 1,6 mg TE /100 g numune ile ağızdaki sindirimden sonra elde edildiği gözlenmektedir. ABTS açısından ise; en yüksek değere ağızda sindirimin (14,6 ± 0,1 mg TE /100 g numune) sonrasında mide (7,1 ± 0,4 mg TE /100 g numune) ve bağırsaktaki sindirimin (5,3 ± 0,7 mg TE /100 g numune) sırayla sahip olduğu görülmektedir (p<0,05).



Şekil 3.3: Normal koşullarda elde edilmiş *S.platensis*' den elde edilen biyoaktif peptitlerin *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı.

*Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Her bir antioksidan kapasite testi içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır ($p<0,05$).

Biyoyararlılık analizi uygulanmış olan SpBAP örneğinde, TFM analizi sonuçları Şekil 3.3'te belirtilmiştir. TFM bakımından en yüksek değere ağızda sindirim sahipken (49,5 ± 1,4 mg GAE /100 g numune), en düşük değer ise bağırsakta sindirimde görülmüştür (10,2 ± 0,8 mg GAE /100 g numune) ($p<0,05$). Cuprac açısından; en yüksek değeri ağızda sindirim göstermişken (141,2 ± 8,8 mg TE /100 g numune), bağırsakta sindirim en düşük değeri vermektedir (21,2 ± 2,0 mg TE /100 g numune) ($p<0,05$). DPPH' te en yüksek değer ağızda sindirimde (43,4 ± 3,3 mg TE /100 g numune) gözlenmişken, ağız ve bağırsakta sindirimde sonuçlar benzer olup ağızda sindirimden düşük değer almışlardır (2,8 mg ± 2,1 TE /100 g numune) ($p<0,05$). ABTS bakımından; en yüksek değer ağızda sindirimden (15,4 ± 0,8 mg TE /100 g numune) elde edilmiş olup, bunu mide (11,6 ± 1,0 mg TE /100 g numune) ve bağırsakta (9,3 ± 1,2 mg TE /100 g numune) sindirim izlemiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.4: Selenyum ile zenginleştirilmiş *S.platensis'* den elde edilen biyoaktif peptitlerin *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığı.

*Sonuçlar en az üç ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Her bir antioksidan kapasite testi içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır (p<0,05).

Biyoyararlılık analizi uygulanmış olan SeBAP örneğinde, TFM analizi sonuçları Şekil 3.4'te belirtilmiştir. TFM bakımından; en yüksek değer ağızda sindirimde (71,0 ± 5,4 mg GAE/100 gr numune) izlenmişken, bunu mide (32,3 ± 2,6 mg GAE/100 gr numune) ve bağırsakta (14,9 ± 1,3 mg GAE/100 gr numune) sindirim takip etmiştir (p<0,05). Cuprac analizi sonuçları incelenecek olursa; Cuprac değerleri büyükten küçüğe sırasıyla sindirim aşamaları için ağız> mide> bağırsak olarak sıralanmıştır. DPPH değerlerinde en yüksek değer ağızda sindirimde (70,1 ± 3,6 mg TE/100 gr numune) elde edilmişken, en düşük değer bağırsakta sindirimde elde edilmiştir (14,5 ± 2,6 mg TE/100 gr numune) (p<0,05). ABTS açısından ise; ağız ve midede sindirim birbirine benzer değerde olup (14,1 ± 1,1 mg TE/100 gr numune), bağırsakta sindirimden daha yüksek değer almıştır (7,1 ± 0,6 mg TE/100 gr numune) (p<0,05).

3.1.2.3 Enkapsülasyon verimi sonuçları

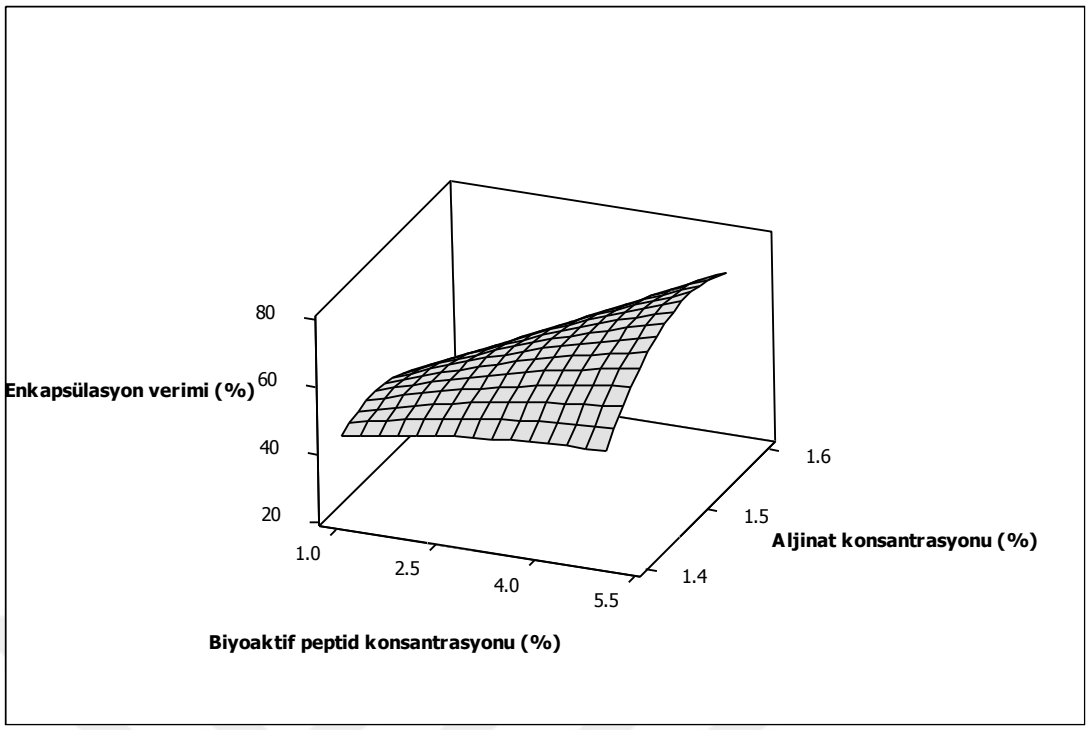
Biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonundaki önemli parametrelerden biri olan enkapsülasyon verimi, enkapsüle edilen üründeki biyoaktif bileşenin konsantrasyonunun enkapsülasyon işlemi öncesindeki konsantrasyonuna oranı olarak tanımlanmaktadır. Enkapsülasyon veriminin kullanılan enkapsülasyon yöntemi ve işlem parametreleri, taşıyıcı malzeme türü, enkapsüle edilen biyoaktif bileşenin özellikleri ve konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilendiği belirtilmektedir. Tez çalışmalarımda *Spirulina*'dan elde edilen biyoaktif peptitler iyonik jelasyon metodu ile, taşıyıcı mazleme olarak aljinat kullanılarak enkapsüle edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan deneysel koşullar altında enkapsülasyon verimi %20,1-93,1 arasında değişmiştir. Enkapsülasyon verimini tahmin eden model verilerdeki varyansın %80,3'ünü açıklamaktadır (Çizelge 3.9). Bu çalışmada incelenen faktörler arasında yalnızca biyoaktif peptit (BAP) konsantrasyonunun enkapsülasyon verimi üzerindeki etkisinin anlamlı olduğu görülmüştür (p<0,05). Çalışmamızda elde edilen en yüksek enkapsülasyon verimi değeri (%93,1), %1,6 aljinat, %3,5 kalsiyum klorür ve %5 BAP konsantrasyonu ile çalışılan deneyde gözlenmiştir. Aljinat ve BAP konsantrasyonunun biyoaktif peptitlerin enkapsülasyon verimi üzerine etkileri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız deneysel koşullar altında BAP konsantrasyonu arttıkça enkapsülasyon veriminin de yükseldiği görülmektedir.

Çizelge 3.9: Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin enkapsülasyon verimi, toplam fenolik madde içeriği (TFM) ve TAK (CUPRAC metodu) ifade eden modellerin regresyon katsayıları.

Katsayı	Enkapsülasyon verimi	TFM	CUPRAC
Sabit	60,15*	279,42*	768,52*
Aljinat (%)	-1,15	10,55	31,78
$CaCl_2$ (%)	-9,02	-13,58	-39,36
BAP (%)	13,61*	99,16*	162,58*
Aljinat (%) × Aljinat (%)	-11,33	3,66	16,89
$CaCl_2$ (%) × $CaCl_2$ (%)	-4,07	8,33	101,56
BAP (%) × BAP (%)	-1,80	-111,96*	-118,79*
Aljinat (%) × $CaCl_2$ (%)	8,28	-17,77	-13,83
Aljinat (%) × BAP (%)	9,57	100,66*	156,86*
$CaCl_2$ (%) × BAP (%)	14,35	39,13	8,50
Model *p* değeri	<0,05	<0,05	<0,05
R^2	0,803	0,799	0,827

*p<0,05.

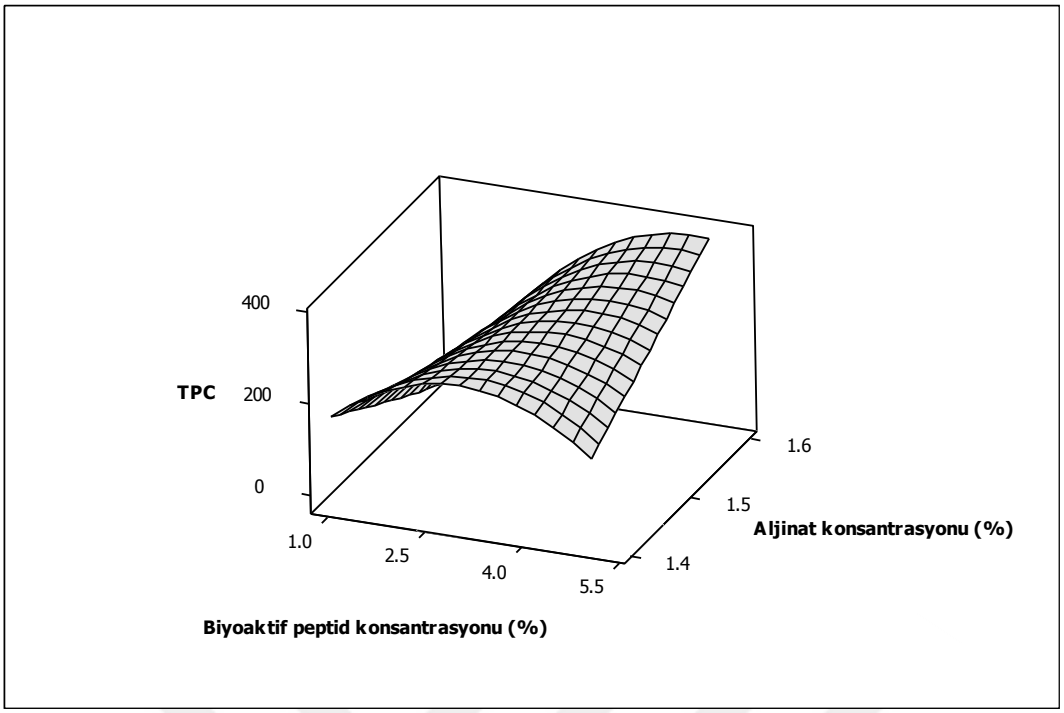


Şekil 3.5: Biyoaktif peptitlerin enkapsülasyon veriminin aljinat konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonu ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.

3.1.2.4 Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri

Toplam fenolik madde içeriği

Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin toplam fenolik madde içeriği (TFM) 28,8-459,7 mg GAE/100 g numune arasında değişmiştir. Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin TFM değerini tahmin eden model verilerdeki değişkenliğin %79,9'unu açıklamaktadır (Çizelge 3.9). BAP konsantrasyonunun hem lineer hem de kuadratik etkisinin enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin TFM değeri üzerindeki etkisinin anlamlı olduğu görülmüştür (p<0,05). Çalışmamızda elde edilen en yüksek TFM değerine (459,7 mg GAE/100 g numune) sahip enkapsüle peptit, %1,6 aljinat, %3,5 kalsiyum klorür ve %5 BAP konsantrasyonu ile üretilmiştir. Aljinat ve BAP konsantrasyonunun biyoaktif peptitlerin TFM değeri üzerine etkileri Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Aljinat ve BAP konsantrasyonunun etkileşimi birlikte incelendiğinde, aljinat konsantrasyonunun %1,4-1,5 olduğu aralıkta BAP konsantrasyonu orta noktadan uzaklaştıkça TFM azalmaktadır. Enkapsüle edilen peptitlerde elde edilen en yüksek TFM değerlerinin yüksek aljinat konsantrasyonu (>%1,5) ve yine yüksek BAP konsantrasyonu (>%4) ile çalışılan deneyler olduğu görülmüştür.

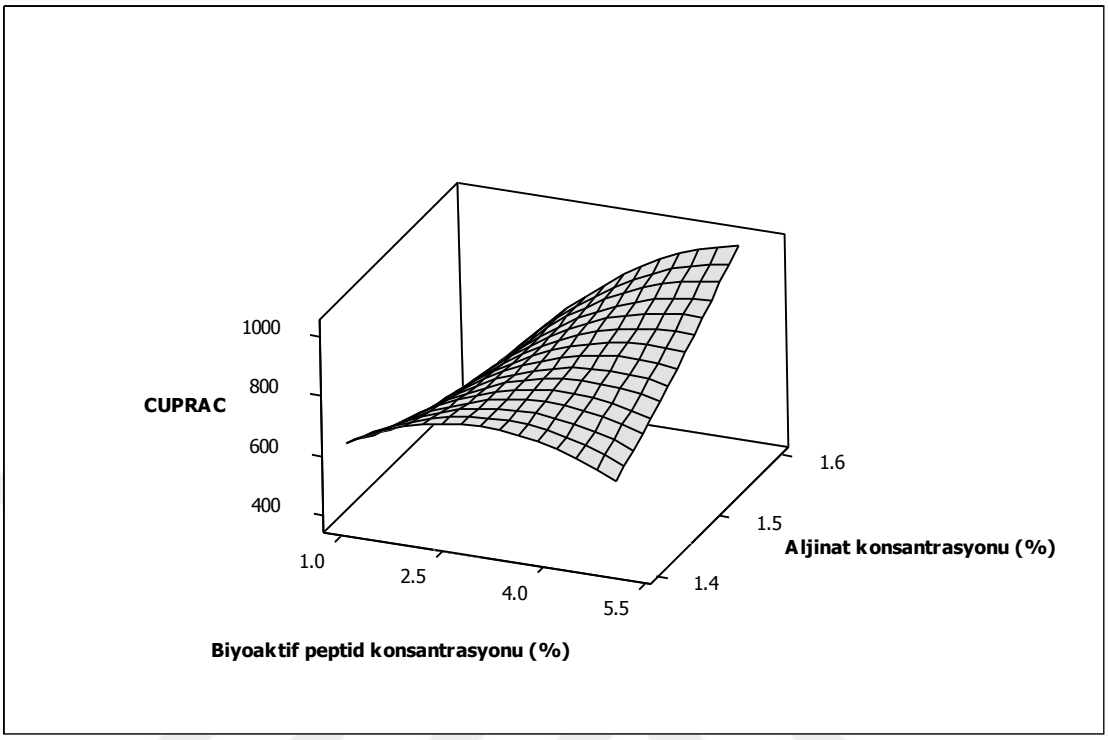


Şekil 3.6: Biyoaktif peptitlerin toplam fenolik madde içeriğinin aljinat konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonu ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.

3.1.2.5 Bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi sonuçları

Tez çalışmam kapsamında enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) değerleri 366,1-1119,5 mg TE/100 g numune arasında değişmiştir. Enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin CUPRAC değerini tahmin eden model verilerdeki varyansın %82,7'sini açıklamaktadır (Çizelge 3.9). CUPRAC değerini etkileyen parametrelerin BAP konsantrasyonunun lineer ve kuadratik etkisi ve aljinat konsantrasyonunun BAP konsantrasyonu ile etkileşimi olduğu görülmüştür (p<0,05). Çalışmamızda elde edilen en yüksek CUPRAC değerine (1119,5 mg TE/100 g numune) sahip enkapsüle peptit, %1,5 aljinat, %2 kalsiyum klorür ve %5 BAP konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Aljinat ve BAP konsantrasyonunun biyoaktif peptitlerin CUPRAC değeri üzerine etkilerini gösteren grafik Şekil 3.7'de verilmiştir. Aljinat ve BAP konsantrasyonunun etkileşimi bir arada incelendiğinde, özellikle aljinat konsantrasyonunun %1,5'un altında olduğu durumlarda BAP konsantrasyonu orta noktadan uzaklaştıkça CUPRAC değerinin düştüğü görülmektedir. Yüksek aljinat konsantrasyonunda (>%1,5) ise BAP konsantrasyonu arttıkça CUPRAC değeri de artmaktadır. BAP konsantrasyonunun %3'ün üzerinde, aljinat konsantrasyonunun ise

%1,6 düzeyinde olduğu çalışma koşullarında enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin CUPRAC değeri 800 mg TE/100 g ve üzerinde bulunmuştur.



Şekil 3.7: Biyoaktif peptitlerin bakır indirgeyici antioksidan kapasitesinin aljinat konsantrasyonu ve biyoaktif peptit konsantrasyonu ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.

Yapılan deneyler sonucu elde edilen enkapsülasyon öncesi ve sonrası TPC ve CUPRAC değerleri Çizelge 3.10'da gösterilmektedir. Elde edilen bu sonuçlara göre enkapsülasyon işlemi öncesi toplam fenolik madde miktarı değeri 824,6±17,2 mg GAE/100g numune iken bu değer enkapsülasyon sonrası 696,34±20,1mg GAE/100g numunedir. CUPRAC değeri ise enkapsülasyon öncesi 3114,2±80 mg TE/100 g numune olarak ölçülmüş ve ayrıca enkapsülasyon sonrası da 2238,93±55 mg TE/100 g numune olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada TPC değerinin enkapsülasyon sonrası değerinin enkapsülasyon işlemi öncesine göre yaklaşık %7 arttığını CUPRAC değerinin ise yaklaşık %28 arttığı gözlenmektedir. Ayrıca bulunan bu değerler literatürdeki diğer benzer çalışmalar ile tutarlıdır (Mosquera ve diğ., 2014; Sarabandi ve diğ., 2019).

Çizelge 3.10: S. Platensis'ten elde edilen biyoaktif peptitler (SpBAP) için enkapsülasyon öncesi ve sonrası TFM ve CUPRAC içeriği.

SpBAP	*Enkapsülasyon Öncesi*	*Enkapsülasyon Sonrası*
TFM[1](mg GAE/100 g numune)	859,15±9,8	919,36±22,1
CUPRAC[2](mg TE/100 g numune)	1747,83±16,1	2238,93±55

Sonuçlar en az beş ölçümün ortalaması ± standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. TFM: Toplam fenolik madde içeriği. CUPRAC: Bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi. SpBAP:Ham *S. platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptit.

[1] %1,6 aljinat, %3,5 $CaCl_2$ ve %5 biyoaktif peptit kullanılarak yapılan enkapsülasyon öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır.

[2] %1,5 aljinat, %2 $CaCl_2$ ve %5 biyoaktif peptit kullanılarak yapılan enkapsülasyon öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır.

3.1.2.6 Optimizasyon ve validasyon sonuçları

Enkapsülasyon verimi ve enkapsüle edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan özellikleri açısından en iyi sonuçları veren koşullar Minitab yazılımın optimizasyon fonksiyonu ile belirlenmiştir. Optimizasyon fonksiyonu çalıştırılırken bağımsız değişkenlerin değerleri çalışma aralıklarında tutulmuş, enkapsülasyon verimi, TFM ve CUPRAC değerleri ise maksimuma çıkarılmıştır. Yüksek enkapsülasyon verimi (%90) ile elde edilen, yüksek TFM (>450 mg GAE/100 g numune) ve CUPRAC (>1200 mg TE/100 g numune) değerlerine sahip enkapsüle BAP eldesi için optimum formülasyon %1,6 aljinat, %2 kalsiyum klorür ve %5 peptit olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda yeni bir enkapsülasyon işlemi yapılarak modelin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Model ile tahminlenen optimum koşullarda enkapsüle edilen biyoaktif peptit numunesinin enkapsülasyon verimi %84 bulunmuştur. Model ile tahmin edilen değer ile deneysel çalışma sonucunda gözlenen değerin yakın olduğu (%6 sapma) görülmüştür.

3.2 Öneriler

Spirulina sahip olduğu karotenoidler, zeaksantin, polifenoller, omega-3 ve omega-6 gibi çoklu doymamış yağ asitleri, fikosiyanin, vitaminler(A,E B vitaminleri gibi) ve polisakkaritler gibi çok çeşitli fitokimyasal içeriği ile kanser, kalp hastalığı, iltihaplanma ve erken yaşlanmanın önlenmesi ve hafifletilmesinde potansiyel bir uygulamaya sahiptir. Bu sebeplerle büyük bir terapötik potansiyeli vardır.

Peptit terapötiklerinin büyük ölçekli üretimi için ticari olarak sürdürülebilir işlemlerin eksikliği, peptitlerin terapötik yardımcılar olarak uygulanmasında büyük bir engel teşkil etmektedir(Agyei & Danquah, 2011).

Yapılan bu tez *Spirulina*'dan biyoaktif peptit elde etmek ve bu elde edilen molekülü daha kararlı hale getirebilmek için uygun yöntem/leri sunar.

Biyoaktif peptit elde etmek için kullanılan yöntemler için genellikle büyük ölçekli teknolojilerin bulunmaması, yüksek saflaştırma maliyeti ve yeterli tekniğin bulunmaması sınırlayıcı olmaktadır. Buna karşın küçük moleküllü ilaçların başka yan etkileri olduğu, dar aktivite spektrumuna sahip oldukları ve hedeflere daha az biyo-spesifik oldukları bilinmektedir. Bu sebeplerle biyoaktif özelliklere sahip doğal ajanlar araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Araştırmacılara, bu engellerin üstesinden gelebilecek alternatif terapötik olan ve hiçbir yan etkisi olmayan *Spirulina*'dan elde edilen biyoaktif peptitler önerilebilir.

Sadece sağlığa katkısıyla değil gıda endüstrisinde gıda katkısı olarak da pek çok faydaya sahiptir. Kararsız yapısına destek olmasının yanısıra özellikle sensör özelliklerini iyileştirebilecek enkapsülasyon yöntemleri ile de gıda sanayinde kendine şimdiye kadar olduğundan çok daha fazla yer bulabilir.

Ayrıca bu tez kapsamında elde edilen veriler, *Spirulina* biyokütlesinden yeni biyoaktif bileşenlerin geliştirilebilmesinin yanı sıra gıdalardaki yeni uygulamalarda da destek sağlayabilir.

Gıda, farmasötik, nutrasötik ve kozmetik pazarlarında da biyoaktif peptit ürünleri için umut vaad eden bir gelecek vardır.

Tüm bunlara ek olarak, biyoaktif peptitlerin özellikle büyük ölçekte üretilebilmesi, izolasyonu ve saflaştırılması için uygun maliyetli yöntemler açısından araştırma yapılmasına ve yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca gelecekteki peptit bazlı gıdaların tasarlanması için de gelişmelere ihtiyaç duyulmaktadır.

4 KAYNAKLAR

Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *29*(3), 272–277. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001

Akev, P. N. (2019). Proteinlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu.

Anand, N., Thajuddin, N., & Dadheech, P. K. (2018). Cyanobacterial Taxonomy: Morphometry to Molecular Studies. Içinde *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00003-9

Anwer, R., Alam, A., Khursheed, S., Kashif, S. M., Kabir, H., & Fatma, T. (2013). Spirulina: Possible pharmacological evaluation for insulin-like protein. *Journal of Applied Phycology*, *25*(3), 883–889. https://doi.org/10.1007/s10811-012-9924-z

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., & Erça, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *57*(5–6), 292–304. https://doi.org/10.1080/09637480600798132

Avigad Vonshak. (1996). *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*.

Belay, A. (2002). The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, *5*(2), 27–48.

Bellmann-Sickert, K., & Beck-Sickinger, A. G. (2010). Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *31*(9), 434–441. https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.06.003

Busson, F. (1971). Spirulina platensis (Gom.) Geitler et Spirulina geitleri J.de Toni. *Cyanophycées Alimentaires, Service de Santé, Marseille.*

Cerciello, A., Del Gaudio, P., Granata, V., Sala, M., Aquino, R. P., & Russo, P. (2017). Synergistic effect of divalent cations in improving technological properties of cross-linked alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, *101*, 100–106. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.077

Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., & Guerard, F. (2009). Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology*, *66*(3), 463–471. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.02.012

Cordone, L., Cottone, G., Cupane, A., Emanuele, A., Giuffrida, S., & Levantino, M. (2015). Proteins in Saccharides Matrices and the Trehalose Peculiarity: Biochemical and Biophysical Properties. *Current Organic Chemistry*, *19*(17), 1684–1706. https://doi.org/10.2174/1385272819666150429232426

Danquah, M., & Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, *1*(2), 1–7. https://doi.org/10.13172/2052-0069-1-2-294

Dasgupta, T., Banerjee, S., Yadav, P. K., & Rao, A. R. (2001). Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by Spirulina platensis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *226*(1–2), 27–38. https://doi.org/10.1023/A:1012721332221

Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*(10), 643–654. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010

Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (Daucus carota L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, *80*(3), 805–812. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009

Faieta, M., Corradini, M. G., Di Michele, A., Ludescher, R. D., & Pittia, P. (2020). Effect of Encapsulation Process on Technological Functionality and Stability of Spirulina Platensis Extract. *Food Biophysics*, *15*(1), 50–63. https://doi.org/10.1007/s11483-019-09602-1

Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., & Zhang, X. (2014). Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(38), 9211–9222. https://doi.org/10.1021/jf502420h

Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1315–1323. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014

Gaysina, L. A., Saraf, A., & Singh, P. (2018). Cyanobacteria in Diverse Habitats. Içinde *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5

Gershwin, M. E., & Belay, A. (2007). *Spirulina in Human Nutrition and Health* (M. E. Gershwin & A. Belay (ed.)). CRC Press.

Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-

fermented food. *Food Research International*, *37*(2), 123–131. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.010

Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, *24*(12), 1551–1557. https://doi.org/10.1038/nbt1267

Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(2), 163–169. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013

Ji, N., Sun, C., Zhao, Y., Xiong, L., & Sun, Q. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. *Food Chemistry*, *161*, 148–154. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.010

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, *46*(1), 60–67. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012

Kargin, H., Mahitap, Y. *, Duru, D., Üniversitesi, M., Fakültesi, S. Ü., Kampüsü, Y., & Yazar, S. (2011). Syanobakteri Spirulina platensis'in Besin Kimyası ve Mikrobiyolojisi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, *4*(1), 31–43. www.nobel.gen.tr

Kaur, H., & Garg, A. (2007). PEPstr: A de novo Method for Tertiary Structure Prediction of Small Bio- active Peptides. *Structure*, 626–631.

Khan, M., Varadharaj, S., Shobha, J. C., Naidu, M. U., Parinandi, N. L., Kutala, V. K., & Kuppusamy, P. (2006). C-phycocyanin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *47*(1), 9–20. https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000191520.48404.27

Kim, N. H., Jung, S. H., Kim, J., Kim, S. H., Ahn, H. J., & Song, K. Bin. (2014). Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *57*(1), 91–95. https://doi.org/10.1007/s13765-013-4211-5

Kim, S. K., Ravichandran, Y. D., Khan, S. B., & Kim, Y. T. (2008). Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *13*(5), 511–523. https://doi.org/10.1007/s12257-008-0113-5

Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, *2*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003

Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2013). Marine-derived Peptides: Development and

Health Prospects. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, *2007*, 1–3. https://doi.org/10.1002/9781118375082.ch1

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, *16*(9), 945–960. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012

Kuhad, A., Tirkey, N., Pilkhwal, S., & Chopra, K. (2006). Renoprotective effect of Spirulina fusiformis on cisplatin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Renal Failure*, *28*(3), 247–254. https://doi.org/10.1080/08860220600580399

Kumaran, A., & Joel Karunakaran, R. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. *Food Chemistry*, *97*(1), 109–114. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.032

Lee, I., Park, C. W., Yoon, S. S., & Yang, H. M. (2019). Facile synthesis of copper ferrocyanide-embedded magnetic hydrogel beads for the enhanced removal of cesium from water. *Chemosphere*, *224*, 776–785. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.199

Li, D. M., & Qi, Y. Z. (1997). Spirulina industry in China: Present status and future prospects. *Journal of Applied Phycology*, *9*(1), 25–28. https://doi.org/10.1023/A:1007973823532

Lissi, E. A., Pizarro, M., Aspee, A., & Romay, C. (2000). Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, *28*(7), 1051–1055. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00193-3

Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G. S., & Chen, F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, *175*, 258–266. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.142

Lu, J., Ren, D. F., Xue, Y. L., Sawano, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2010). Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of spirulina platensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(12), 7166–7171. https://doi.org/10.1021/jf100193f

Luo, X., Fei, Y., Xu, Q., Lei, T., Mo, X., Wang, Z., Zhang, L., Mou, X., & Li, H. (2020). Isolation and identification of antioxidant peptides from tartary buckwheat albumin (Fagopyrum tataricum Gaertn.) and their antioxidant activities. *Journal of Food Science*, *85*(3), 611–617. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15004

Ma, S., Zhang, M., Bao, X., & Fu, Y. (2020). Preparation of antioxidant peptides from oat globulin. *CYTA - Journal of Food*, *18*(1), 108–115. https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1716076

Ma, Y., Liu, J., Shi, H., & Yu, L. (Lucy). (2016). Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *Journal of Dairy Science*, *99*(9), 6902–6912. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11186

Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from Spirulina platensis for food industry applications. *Process Biochemistry*, *49*(1), 154–159. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.008

Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: Antioxidant activity assessed using the ABTS•+ radical cation. *British Food Journal*, *99*(2), 57–62. https://doi.org/10.1108/00070709710165197

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, *5*(6), 1113–1124. https://doi.org/10.1039/c3fo60702j

Mosquera, M., Giménez, B., Da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, *156*, 144–150. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011

Nogoy, F. M., Niño, M. C., Song, J. Y., Jung, Y. J., Kang, K. K., Nou, I., & Cho, Y. G. (2003). DIET, NUTRITION AND THE PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. Içinde *WHO Technical Report Series 916*. https://doi.org/10.1007/s11816-018-0468-9

Nooshkam, M., & Madadlou, A. (2016). Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides. *Food Chemistry*, *192*, 831–836. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.094

Ovando, C. A., Carvalho, J. C. de, Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2018). Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review. *Food Reviews International*, *34*(1), 34–51. https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1210632

Pagnussatt, F. A., De Lima, V. R., Dora, C. L., Costa, J. A. V., Putaux, J. L., & Badiale-Furlong, E. (2016). Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from Spirulina sp. LEB-18 on their antifusarium activities. *Food Chemistry*, *211*, 616–623. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.098

Panchal, G., Hati, S., & Sakure, A. (2020). Characterization and production of novel antioxidative peptides derived from fermented goat milk by L.

fermentum. *Lwt*, *119*(November 2019), 108887. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108887

Percival, S. L., & Williams, D. W. (2013). Cyanobacteria. Içinde *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition* (Second Edi). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00005-6

Piero Estrada, J. E., Bermejo Bescós, P., & Villar del Fresno, A. M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract. *Farmaco*, *56*(5–7), 497–500. https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01084-9

Reichwaldt, E. S., & Ghadouani, A. (2012). Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water Research*, *46*(5), 1372–1393. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.052

Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients*, *3*(9), 765–791. https://doi.org/10.3390/nu3090765

Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Abdul Hamid, A., & Ghazali, H. M. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, *33*(1), 80–116. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003

Saavedra, L., Hebert, E. M., Minahk, C., & Ferranti, P. (2013). An overview of "omic" analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Research International*, *54*(1), 925–934. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.034

Samarakoon, K., & Jeon, Y. J. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. *Food Research International*, *48*(2), 948–960. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.013

Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, *251*(February), 19–28. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004

Satyanarayana, L., Patel, A., Mishra, S., Ghosh, P., & Suresh, C. G. (2008). *Crystal structure of C-phycocyanin from Phormidium, Lyngbya spp. (Marine) and Spirulina sp. (Fresh water) shows two different ways of energy transfer between two hexamers.* http://www.rcsb.org/structure/2uun

Sayari, N., Sila, A., Haddar, A., Balti, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Bougatef, A. (2016). Valorisation of smooth hound (Mustelus mustelus) waste biomass through recovery of functional, antioxidative and

antihypertensive bioactive peptides. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(1), 366–376. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5244-6

Singh, B. P., Vij, S., & Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, *54*, 171–179. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022

Spanos, G. A., & Wrolstad, R. E. (1990). Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Thompson Seedless Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(7), 1565–1571. https://doi.org/10.1021/jf00097a030

Sun, L. (2013). Modern Chemistry and Applications Peptide- Based Drug Development Advantages and Disadvantages Peptide-Based Drug Development. *Mod. Chem. appl.*, *1*(1), 1–2. https://doi.org/10.4172/mca.1000e103

Verdasco-Martín, C. M., Echevarrieta, L., & Otero, C. (2019). Advantageous preparation of digested proteic extracts from Spirulina platensis biomass. *Catalysts*, *9*(2). https://doi.org/10.3390/catal9020145

Vo, T. S., Ryu, B. M., & Kim, S. K. (2013). Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal Spirulina maxima. *Journal of Functional Foods*, *5*(3), 1336–1346. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.001

Wang, Z., & Zhang, X. (2017). Isolation and identification of anti-proliferative peptides from Spirulina platensis using three-step hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(3), 918–922. https://doi.org/10.1002/jsfa.7815

You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Purification and identification of antioxidative peptides from loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, *43*(4), 1167–1173. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.009

Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., Liang, Y., & Zhao, S. (2016). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of spirulina platensis. *Journal Microbiol. Biotechnol*, *26*(7), 1216–1223. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1601.01033

Zeng, M., Cui, W., Zhao, Y., Liu, Z., Dong, S., & Guo, Y. (2008). Antiviral active peptide from oyster. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *26*(3), 307–312. https://doi.org/10.1007/s00343-008-0307-x

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad **: E. Simge Karlığa**

Doğum Tarihi ve Yeri **: 18.04.1994 - İstanbul**

E-posta **:** smgkrlg@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2017, YTÜ,
  Kimya-Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

AKADEMİK YAYINLAR:

06/2020 The Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism
"Interactions of Different Phenolics with Food Matrix: *İn vitro* and *İn vivo* Approaches"

11/2019 *International Congress on 'EURASIA Natural Nutrition and Healthy Life' 2019 Poster ve Kongre Kitapçığı Bildirisi*
" Invertase Activity in Different Honey Samples Collected from the Turkish Market "

06/2017 Ph'a Duyarlı Hemiasetal Ester Yapılar İçeren Polimerik Kürelerin Sentezi (Lisans Tezi)

04/2015 Ulusal Aşı Bilimi Kongresi Poster Bildirisi, İzmir Üniversitesi
'İnsanlarda Görülen Enfeksiyöz Ajanlara Karşı Geliştirilen Aşılar'
" Leishmaniasis'e karşı yüzey moleküllerine dayalı geliştirilmek üzere L.tropica parazitlerinin büyük ölçekli çoğaltılmasının optimizasyonu "